



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Sistemi Agro-Ambientali
Indirizzo Agro-Ecosistemi Mediterranei
Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali
Settore Scientifico Disciplinare AGR/02

**Ottimizzazione delle strategie di conservazione del germoplasma
di *Hypericum* spp. della flora spontanea siciliana**

Anno conseguimento titolo 2015

XXV CICLO

PhD student

Dott.ssa Silvia Lazzara

Tutor

Prof.ssa Alessandra Carrubba

Coordinatore del dottorato

Prof. Giuseppe Giordano

*A mio marito e mio figlio
Pazienti e collaboratori*

Un ringraziamento di cuore va a tutti quelli che mi hanno aiutato e sostenuto. Ciascuno è stato importante, affinché questo lavoro si potesse realizzare, familiari , amici, colleghi e collaboratori.

Gaetano Mazza, FrancescoGabriele Mazza, Luigi Lazzara, Aldo Lazzara, Nicola Siemoni, Teresa Siemoni, Alessandra Carrubba, Adele Salamone, Mercedes Verdeguer-Sancho, Giusi Cammuca, Claudia Trapani, Giovanni Gugliuzza, Giancarlo Fascella, MariaCarola Fiore, Antonio Giovino, Massimo Mammano, Santo Agnello, Rosalia Cusimano, Gaetano Giardina, Gaspare Barbera, Marcello Airò, Marcello Militello, Sergio Saia, Giuseppe Mannino, Paolo Gagliano.

*Ottimizzazione delle strategie di conservazione del germoplasma di **Hypericum spp.** della
Flora spontanea siciliana*

INDICE

1. <u>INTRODUZIONE</u>	3
1.1 STORIA: nel mondo, nel Mediterraneo, in Italia.....	3
1.2 BOTANICA	6
Inquadramento sistematico: aspetti tassonomici e botanici.....	6
In Italia e in Sicilia	6
1.3 PROPRIETA'	8
Principi attivi	8
Usi	10
Importanza economica.....	12
1.4 PRODUZIONE	15
Miglioramento della qualità	15
Tecniche agronomiche.....	17
Prospettive	17
2. <u>OBIETTIVI DELLA RICERCA</u>	18
3. <u>MATERIALI E METODI</u>	20
3.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE INDAGATE	20
3.1.1 Raccolta e conservazione del materiale vegetale e dei semi	20
3.1.2 Descrizione botanica e habitat.....	21
3.1.3 Caratterizzazione chimica	22
3.1.4 Caratterizzazione molecolare	24
3.2 STUDIO DI ALCUNI ASPETTI DELL'AGROTECNICA	25
3.2.1 Moltiplicazione gamica	25
Germinazione <i>in vitro</i>	27
Germinazione <i>in vivo</i>	28
3.2.2 Prove di propagazione agamica	29
Taleggio	30
Micropropagazione	30
3.2.3 Prove di adattabilità alle condizioni di pieno campo ed in vaso	31
3.2.4 Prove di micorizzazione.....	33
3.2.5 Studi sull'influenza del fotoperiodo sulla fioritura	35
3.2.6 Studi preliminari di resistenza/tolleranza allo stress salino.....	36
3.2.7 Potenzialità di utilizzo in ambito florovivaistico	37

4. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	39
4.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE INDAGATE	39
4.1.1 Raccolta e conservazione del materiale vegetale e dei semi	39
4.1.2 Descrizione botanica e habitat	44
4.1.3 Caratterizzazione chimica	53
4.1.4 Caratterizzazione molecolare	58
4.2 STUDIO DI ALCUNI ASPETTI DELL'AGROTECNICA	62
4.2.1 Moltiplicazione gamica	62
Germinazione <i>in vitro</i>	62
Germinazione <i>in vivo</i>	68
4.2.2 Prove di propagazione agamica	68
Taleggio	68
Micropropagazione	73
4.2.3 Prove di adattabilità alle condizioni di pieno campo ed in vaso	73
4.2.4 Prove di micorrizzazione	77
4.2.5 Studi sull'influenza del fotoperiodo sulla fioritura	79
4.2.6 Studi preliminari di resistenza/tolleranza allo stress salino	80
4.2.7 Potenzialità di utilizzo in ambito florovivaistico	83
5. <u>CONCLUSIONI</u>	85
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	88
7. <u>ALLEGATI</u> Lavori pubblicati nel corso del triennio di dottorato	102

1. INTRODUZIONE

1.1 STORIA: nel mondo, nel Mediterraneo, in Italia.

Dai tempi più remoti le piante sono state per l'uomo fonte di vita e di sostentamento ed il loro impiego ha aiutato l'essere umano a curare i mali che lo hanno afflitto. In ogni luogo l'uomo ha imparato a conoscere le virtù e le insidie che dal loro uso ne poteva derivare.

Le prime notizie di medicinali vegetali risalgono alla Cina, con l'imperatore cinese Chen-nong, padre della medicina cinese e inventore dell'agopuntura, intorno al 3000-2700 a.C., che sperimentò su di sé l'efficacia delle 365 medicine, derivate da minerali, piante e animali, descritte nel primo erbario e trattato di materia medica del mondo, il *Grande Erbario*.

In India il medico Charaka scrisse nel VIII sec. a.C. il *Charaka Samhita*, uno dei testi fondamentali dell'Ayurveda, il sistema di medicina naturale più antico (2500 a.C.) di cui l'uomo abbia memoria. Il testo tratta ogni aspetto clinico, basato su erbe e piante medicinali, per il mantenimento della salute e la prevenzione della malattia, studiandone l'origine (homolaicus.com).

In Egitto antiche iscrizioni e pitture sulle pareti dei templi e delle tombe ci parlano dell'uso che si faceva di almeno 500 diverse specie di piante intorno al 3000 a.C. Gli antichi Egizi conoscevano più di settecento forme di medicinali, sia di natura vegetale che animale, il più antico documento che è arrivato a noi è il *Papiro di Ebers* (1500 a. C.), una raccolta di testi di medicina risalenti alla XVIII dinastia egizia.

In America centrale troviamo i Maya, considerato il popolo più progredito e civile dell'epoca precolombiana, che tenevano in gran conto l'igiene, erano eccellenti conoscitori dell'anatomia e della chirurgia, e la loro terapia farmacologica si basava sull'uso delle piante medicinali. Gli aztechi conoscevano circa 3.000 piante, come risulta da un erbario tradotto da Johannes Badianus, conservato presso la Biblioteca Vaticana.

La Grecia classica è senza dubbio debitrice alla cultura egizia e mesopotamica e già nel IV secolo a.C. diversi scrittori iniziarono a raccogliere e a vagliare sistematicamente le conoscenze, vere o false, sulle piante e sui loro usi. Fu Ippocrate di Coa (460-377 a.C.), il più celebre medico dell'antichità greca e padre della medicina occidentale, a classificare per la prima volta in modo organico 400 specie di piante medicinali. Il primo trattato sistematico di botanica farmaceutica, il *De historia plantarum*, fu scritto da Teofrasto (372-287 a.C.). Tra i più antichi orti o giardini botanici del mondo si ricordano quelli di Alessandria d'Egitto (sotto i Tolomei, dal IV secolo a.C.) e quello istituito ad Atene,

intorno al 340 a.C., a scopo di studio e per volontà di Aristotele, che ne affidò la gestione al discepolo Teofrasto. Il più antico erbario illustrato giunto fino a noi e anche la più antica testimonianza della Farmacopea fu quello di Dioscoride (Dioscoride Pedanio), grande maestro di farmacognosia dei suoi tempi, medico greco di Anazarbo (Cilicia) del I sec. d.C, poi divenuto cittadino romano.

Per quanto riguarda i Romani, essi grazie all'influenza greca, intorno al I secolo d. C., iniziarono ad impiantare "orti medicinali" nei quali si provvedeva alle colture di piante utilizzabili nella terapia medica. Tra coloro che potremmo ricondurre al ruolo di farmacologi e sperimentatori, ricordiamo Eracleide di Taranto che sperimentò e usò forme medicinali nuove e compose elaborate ricette, alcune delle quali vennero successivamente riprese dal grande medico Celso (18 a.C.-39 d.C.) (Suozz 1998).

Nel mondo occidentale la pianta dell'*Hypericum* (Erba di S. Giovanni) viene utilizzata da oltre 2000 anni (Spitali 1999). Nel I secolo d.C., il naturalista romano Plinio il Vecchio nella sua *Historia Naturalis* ne testimonia l'utilizzo e la prescrive per curare le ferite dei gladiatori. Il medico greco Dioscoride elenca, nel "*De Materia Medica*", ben quattro specie di iperico utili. Galeno, grande medico greco del II secolo d.C., trasferitosi a Roma nell'epoca di Marco Aurelio, fa dell'iperico una vera pianta medicinale. Le sue raccomandazioni divennero per guaritori e futuri medici vere e proprie prescrizioni, infatti l'iperico è stato rimedio principe di medici e ospedali militari per trattare e far cicatrizzare velocemente ferite, arti amputati e, per estensione, per la cura di ulcere di vario genere. Sembra che i veri protagonisti della diffusione dell'iperico nelle varie regioni europee siano stati proprio i soldati romani che, oltre alle ferite, curavano e alleviavano con l'olio di iperico i dolori ai piedi messi a mal partito da lunghe ed estenuanti marce (Chia 2005).

La fama dell'iperico prosegue con la storia dei Templari, che nel XII secolo furono i primi a scoprire che la pianta, oltre alle ustioni e alle ferite da taglio, era utilissima per migliorare l'umore dei guerrieri che rimanevano immobilizzati a letto per mesi.

Dal Cinquecento in poi, e per gran parte dei secoli che seguirono, l'uso dell'iperico nella tradizione popolare è legato a ciò che ne dice Paracelso (pseudonimo dello svizzero Teofrasto Bombast von Hohenheim, 1493-1541) figura affascinante di quel periodo, che dette forte impulso alla riscoperta delle piante indigene europee.

Il suo utilizzo medicamentoso era molto diffuso anche in Russia e specie di iperico, diverse da *H. perforatum*, venivano usate anche dagli indiani d'America per utilizzi fondamentalmente simili a quelli già descritti. L'*H. perforatum* invece venne introdotto in America dai coloni europei e si diffuse poi allo stato spontaneo un po' dappertutto.

Nel 1618 ritroviamo l'Iperico citato in un famoso erbario inglese, la “*Farmacopea di Londra*” che consigliava di triturne i fiori, immergerli in olio ed esporre la mistura al sole per tre settimane ottenendone una tintura, trattamento ideale per ferite e contusioni.

L'uso dell'iperico continua nel tempo a livello popolare ed empirico mentre l'approccio della medicina ufficiale si allontana progressivamente da questi rimedi del passato. Le cure tradizionali a base di erbe vengono relegate nella categoria della superstizione, tendenza che percorre tutto l'Ottocento e buona parte del Novecento, periodo in cui nasce e si sviluppa la chimica e l'industria del farmaco. In tempi più recenti appare finalmente una pubblicazione in una rivista scientifica di fama internazionale (British Medical Journal, agosto del 1896) di uno studio che ripropone, con approccio scientifico, il suo uso contro la depressione, “... l'estratto d'iperico è più efficace del placebo nel trattamento di disturbi depressivi di tipo medio o moderato”, e che conduce alla sua riscoperta ufficiale.

Altre segnalazioni contemporanee su svariate specie di iperico ne indicano gli utilizzi medicinali tradizionali in molte parti del mondo: *Hypericum aethiopicum* in Centro Africa, *H. crispum* in Tunisia, Cipro e Medio Oriente, *H. revolutum* in Africa centrale, Rwanda, *H. canariense* e *H. grandifolium* nelle Isole Canarie, Macaronesia, *H. glandulosum* in Madeira, Macaronesia, *H. erectum* in Giappone, *H. japonicum* in Cina e aree circostanti, *H. hookerianum*, *H. patulum* o *H. uralum* in India.

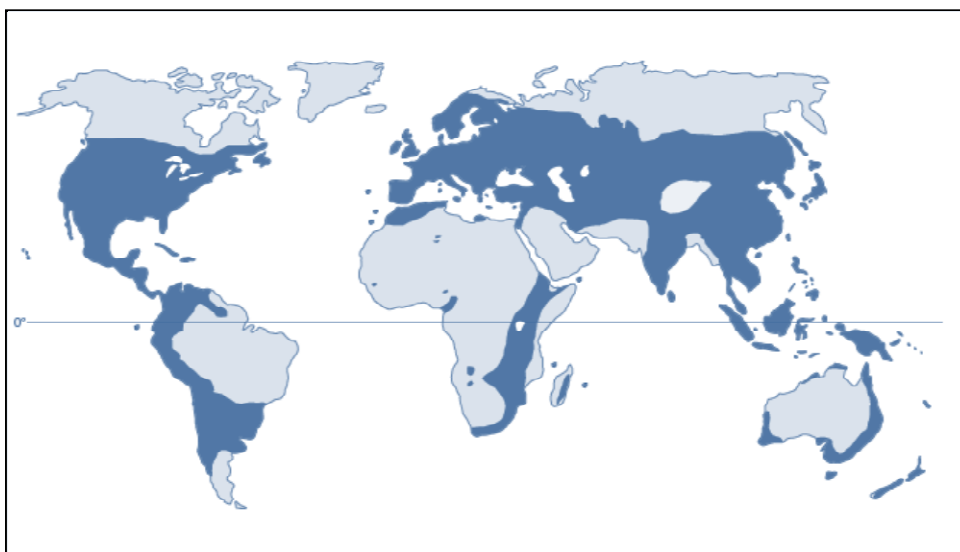
Attualmente il genere *Hypericum* è molto indagato e la ricerca ne ha fatto un vero e proprio “esempio di pianta studio” ad ulteriore testimonianza della sua diffusione ed importanza nel mondo.

In Italia l'interesse per la pianta è dimostrato dalle molte pubblicazioni, scientifiche e divulgative, che si possono reperire. Se ne ricorda, con fasi alterne, il suo uso fin dai primi secoli dopo Cristo, la tradizione lo vuole impiegato nelle affezioni all'apparato respiratorio (tosse) (Pieroni *et al* 2004), per il trattamento della depressione lieve-moderata (Borrelli e Izzo 2009) e per uso esterno, in forma di estratto oleoso (oleolita) nella cura dell'artrosi e dei reumatismi (Foddìs e Maxia 2006) e di tutte le lesioni (ferite, ustioni, ulcere) della cute (Spitali 1999; Bruni *et al* 2003).

1.2 BOTANICA

- Inquadramento sistematico: aspetti tassonomici e botanici

Dai tempi di Linneo il genere *Hypericum* è stato trattato come unità naturale dalla maggior parte dei tassonomisti anche se la discussione se trattare questo genere e i suoi parenti più stretti, come una famiglia separata o come parte della sottofamiglia *Hypericoideae*, all'interno delle *Guttiferae sensu lato*, è controversa. Nove generi sono stati assegnati tassonomicamente alle *Hypericaceae* ed il genere *Hypericum* L. contiene approssimativamente l'80% della diversità della famiglia botanica (Crockett e Robson 2011).



Distribuzione del genere *Hypericum* nel mondo (Nürk 2011)

Il genere *Hypericum* L. è quindi uno dei nove generi che compone la famiglia botanica delle *Hypericaceae* (APG III, 2009) ed è costituito approssimativamente da quasi 500 specie (Crockett e Robson 2011) tra arboree, arbustive, lianose ed erbacee, ampiamente distribuite negli habitat più diversificati tanto da essere considerato in alcune regioni, nel caso di *H. perforatum* perfino invasivo (Buckley *et al* 2003). Il maggior centro di diversificazione, deducibile dal maggior numero di specie riscontrate, può essere collocato nelle regioni temperate dell'emisfero nord (Crockett e Robson 2011).

- In Italia e in Sicilia

In Italia, secondo quanto riportato nella checklist della flora vascolare italiana da Conti *et al* (2005), il genere *Hypericum* è rappresentato da 30 taxa, di cui 26 specie e 4 sottospecie, distribuite dalle zone costiere e di bassa pianura fino ad habitat montani elevati

(circa 1600 m slm), e più precisamente: *H. aegypticum*, *H. androsaemum*, *H. annulatum*, *H. australe*, *H. balearicum*, *H. barbatum*, *H. calycinum*, *H. coris*, *H. elodes*, *H. hircinum* (subsp. *mayus*), *H. hirsutum*, *H. humifusum*, *H. hyssopifolium*, *H. maculatum*, *H. montanum*, *H. mutilum*, *H. nummularium*, *H. perfoliatum*, *H. perforatum*, (subsp. *perforatum*, *veronense* e *angustifolium*), *H. pubescens*, *H. pulchrum*, *H. richeri*, (subsp. *richeri*), *H. spruneri*, *H. tetrapterum*, *H. tomentosum*, *H. triquetrifolium*.

Notizie puntuali sulla distribuzione in Italia dei taxa della serie *Hypericum* sono riportate da Ciccarelli e Garbari (2004) in “Le unità italiane di *Hypericum* ...”.

Nella flora siciliana, il genere *Hypericum* è rappresentato da 11 taxa nativi (Giardina *et al* 2007) uniformemente distribuiti all'interno dell'isola dalle zone costiere, aride e soleggiate, a quelle riparie più umide, fino a quelle boscate e montane, *H. aegypticum*, *H. androsaemum*, *H. australe*, *H. hircinum* (subsp. *mayus*), *H. perfoliatum*, *H. perforatum*, (subsp. *perforatum* e *veronense*), *H. pubescens*, *H. tetrapterum* e *H. triquetrifolium*. Recentemente è stata inserita la specie *H. calycinum* considerata come naturalizzata (Castellano e Spadaro 2010).

1.3 PROPRIETA'

- Principi attivi

È noto da secoli che le cime fiorite del genere *Hypericum* contengono preziose sostanze bioattive, le cui proprietà sono globalmente riconosciute ma di cui ancora non si conosce la completa composizione. Via via che le tecniche analitiche si sono perfezionate le indagini hanno rivelato una elevata complessità metabolica. Saxena *et al* (2007) riportano nella composizione chimica di *H. perforatum* ben 190 diversi metaboliti secondari, alcuni ancora non ben identificati, appartenenti a classi chimiche diverse.

Secondo Crockett (2005) il complesso fitoterapico contenuto in queste piante comprende principalmente due gruppi di composti, il primo che si caratterizza per la relativa idrofilia (proantocianine, flavonoidi, biflavonoidi, xantoni, fenilpropani e naftodiantroni, quali ipericina e pseudipericina) ed il secondo di natura più idrofoba (costituenti volatili degli oli essenziali come i monoterpeni e sesquiterpeni, e acilfloroglucinoli, quali iperforina e adiperforina).

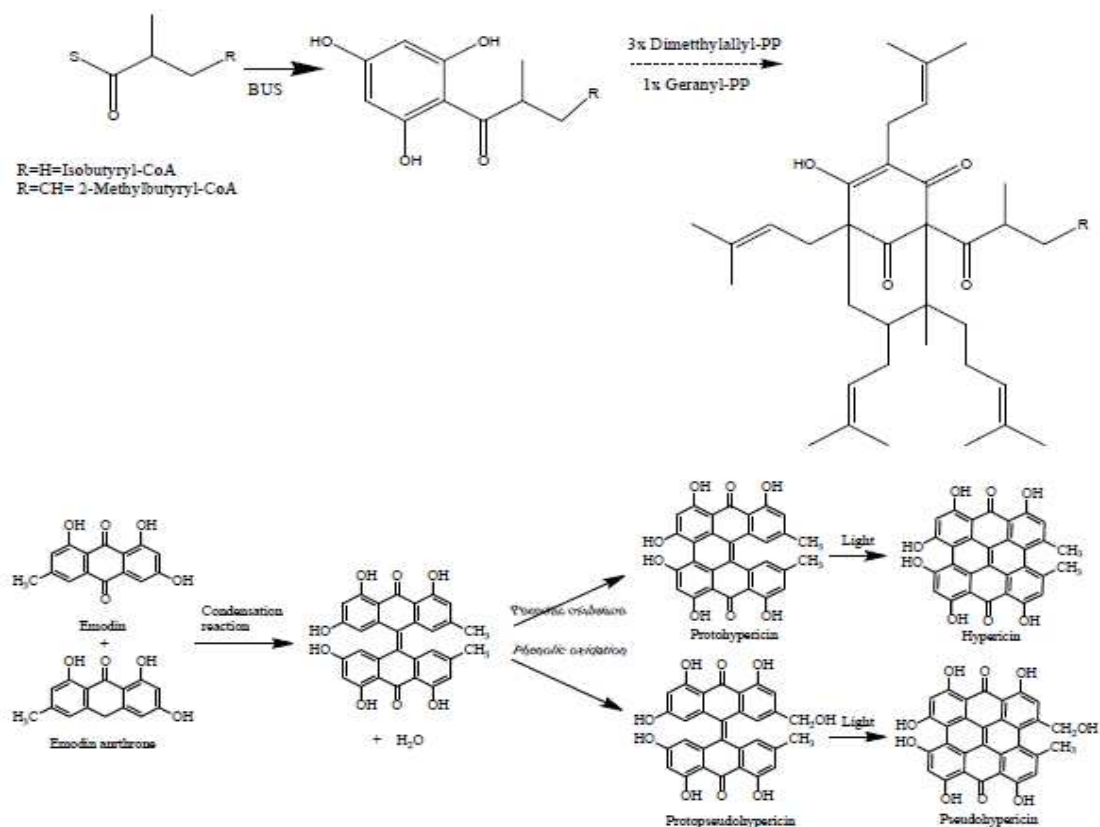
Patočka (2003) lavorando su estratti idroalcolici, ottenuti trattando le cime fiorite della pianta con etanolo al 60% o con metanolo all'80%, ha identificato uno spettro di sei principali gruppi di prodotti naturali: 1) naftodiantroni, 2) floroglucinoli, 3) flavonoidi, 4) biflavoni, 5) fenilpropani e 6) proantocianidine. Inoltre ha rilevato quantità minori di tannini, xantoni, oli essenziali e aminoacidi.

Stojanović *et al* (2013) suddividono invece i componenti chimici presenti in *Hypericum* spp. in volatili e non volatili e concentrano l'indagine sui composti non volatili, 10 dei quali considerati di particolare interesse per l'industria farmaceutica: ipericina, pseudoipericina, iperforina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, iperoside, rutina, amentoflavone e biapigenina.

La variabilità nei componenti e nella loro quantità indubbiamente dipende da molti fattori, primo fra tutti la specie, anche se quasi tutte le unità tassonomiche di questo genere presentano lo stesso "spettro" chimico. I due differenti tipi di ghiandole presenti nei diversi organi della pianta contengono gli stessi metaboliti secondari in diversa misura e tipologia: le ghiandole nere sembrano contenere prevalentemente ipericine, e le ghiandole translucide soprattutto iperforine (Bruni e Sacchetti 2009). Inoltre, le ipericine si trovano principalmente negli stami e nei petali di fiori e diminuiscono significativamente in fase di raccolta (i boccioli chiusi ne contengono 10 volte più delle capsule mature), mentre le iperforine si trovano soprattutto nei pistilli e nei frutti e aumentano in fase di raccolta; da qui l'importanza della fase ontogenetica nell'individuazione dell'epoca di raccolta

(Poutaraud e Girardin 2004). La conoscenza della via biosintetica delle ipericine permette in parte di comprendere tali variazioni (fig. 1, Bruni e Sacchetti 2009).

Figura 1. Via biosintetica per la formazione delle ipericine



I composti che comprendono i flavonoidi (iperoside, rutina, quercitrina e quercetina) e biflavoni (amentoflavone e biapigenina) sembrano invece trovarsi accumulati nei vacuoli delle parti floreali deiscenti (sepali, petali, stami) (Bruni e Sacchetti 2009).

Nonostante non sia ancora del tutto chiaro quali siano i principi responsabili dell'attività biologica dell'iperico, le preparazioni usate in terapia sono standardizzate sul contenuto totale in ipericine.

La Farmacopea Europaea prende infatti come indice di riferimento per valutare la qualità della droga, il contenuto totale di naftodiantroni ovvero in ipericine (ipericina e pseudoipericina) sull'estratto secco. La concentrazione di ipericine nei germogli e nei fiori può però variare tra lo 0,06 % e lo 0,75 %. Dal punto di vista della qualità commerciale è necessaria una quantità minima di ipericina pari allo 0,04 % (Wagner e Bladt 1994). Saxena *et al* (2007) riporta una presenza media di ipericine intorno allo 0,3 %, di iperforina tra il 3 e il 5 % sul peso secco e di flavonoidi del 4-5 %. I flavonoidi costituiscono un altro importante gruppo di costituenti chimici, efficaci come antiossidanti e presenti in notevole

quantità (es.:1,6 % di rutina). Nello stesso lavoro vengono elencati i numerosi oli essenziali ottenuti da diverse specie di iperico, rilevati da molti autori, recentemente valorizzati come antimicrobici e fungicidi (Bertoli *et al* 2011). Nel complesso, in letteratura si parla di almeno 190 componenti rilevati nell'estratto di *H. perforatum* (Saxena *et al* 2007).

- Usi

Le medicine tradizionali e popolari in molte parti del mondo utilizzano specie appartenenti al genere *Hypericum* per una miriade di scopi diversi. Le proprietà curative ad esse riconosciute sono molteplici; alcune sono note da secoli, e in virtù di esse l'iperico è annoverato nei più diversi sistemi di medicina tradizionale (Crockett 2010).

Di fatto, per quasi tutte le specie congeneri è disponibile un gran numero di informazioni riguardanti usi tradizionali, indagini e analisi chimiche; uniche eccezioni *H. aegypticum*, *H. australe* e *H. pubescens*, di cui in letteratura si trovano solo informazioni sugli aspetti botanici, in qualche caso apprezzandone il solo valore naturalistico. Tra le altre specie, *H. androsaemum* viene citato per uso ornamentale e terapeutico (per il trattamento di coliche e cattiva digestione) (Guedes 2009); per la cura di problemi renali ed emicranie (Guedes *et al* 2012); per uso diuretico, epatoprotettivo e antiossidante (Almeida *et al* 2009); antibatterico (Mazandarani *et al* 2003); nematotossico (Guedes *et al* 2009); *H. calycinum* viene citato per uso ornamentale e terapeutico per la presenza di oli essenziali (Maggi *et al* 2010). *H. hircinum* è indicato per uso terapeutico, per tosse, malattie della gola e bronchiti (Pieroni *et al* 2004), per la presenza di oli essenziali è citato come antimicrobico (Pistelli *et al* 2000) ed antifungino (Bertoli *et al* 2011), ed ha mostrato anche un'elevata attività antiossidante ed antiradicalica (Mandrone *et al* 2014); *H. hirsutum* viene usato come antiinfiammatorio e gastroprotettivo (Zdunic *et al* 2014) contiene elevate quantità di olio essenziale (Maggi *et al* 2010), è caratterizzato dalla presenza delle sole ipericine e dall'assenza di iperforina (Kitanov 2001). *H. montanum* possiede invece un elevato contenuto in ipericine (Kusari *et al* 2009) ma un basso contenuto in oli essenziali (Maggi *et al* 2010). *H. perforatum*, con un contenuto in ipericine simile ad *H. perforatum* viene citato per il suo uso come lenitivo del dolore e cicatrizzante sulle ferite, in cui stimola la creazione di nuovi tessuti (Bombardelli e Morazzoni 1995). *H. richeri* è indicato come antiinfiammatorio (Savikin *et al* 2007) e l'analisi chimica indica la presenza delle sole ipericine senza iperforina (Kitanov 2001). *H. tetrapterum* è descritto per la sua ricchezza in oli essenziali (Maggi *et al* 2010) e per gli alti contenuti in iperforina e quercitrina (Smelcerovic *et al* 2006). *H. triquetrifolium*, ad alto contenuto in ipericine,

viene citato come fungicida (Fraternale *et al* 2006) e come antivirale (De Clercq 2000). *H. patulum* trova un uso prevalentemente ornamentale, ma contiene apprezzabili quantità di oli essenziali; in Cina, gli impacchi dei semi sono impiegati su punture di insetti (Brink 1999).

H. perforatum, specie più cosmopolita e più largamente utilizzata delle altre, tra tutti gli *Hypericum* è stato indubbiamente il più studiato, e fin dall'inizio degli anni '90 numerosi lavori ne hanno affrontato aspetti relativi sia alla composizione chimica che all'attività biologica (Röder *et al* 2004). Di fatto, soltanto per questa specie, nei lavori etnofarmacologici e medici viene riportato un elenco di 80 diversi usi (Saxena *et al* 2007) tra cui una molteplicità di applicazioni terapeutiche, dall'antidepressiva (Wang *et al* 2010) all'antinfiammatoria e antivirale (Poutaraud e Girardin 2004), alla antiossidante (Statti *et al* 2011), antimicrobica (Nacif de Abreu *et al* 2004) ed antiproliferativa (Crockett e Robson 2011).

In Italia la più nota, diffusa e antica è l'utilizzazione dell'oleolito di *H. perforatum*, ottenuto per macerazione dei fiori in olio extravergine di oliva, dotato di azione antiinfiammatoria e cicatrizzante, e destinato alla terapia di ferite e ustioni (Spitali 1999, Franchi *et al* 2011). Questo uso è stato recentemente riesaminato da Suntar *et al* (2010), che concludono affermando che "*H. perforatum* possiede una straordinaria efficacia nella guarigione di ferite". Per la cura di artrosi e reumatismi viene invece tradizionalmente adoperato un macerato in olio d'oliva e vino bianco (Foddìs e Maxia 2006).

L'attività antidepressiva di *H. perforatum* è certamente la causa principale dell'entusiasmo incontrato da questo estratto vegetale (Linde *et al* 2008). L'uso classico dell'estratto secco (alcolico) delle sommità fiorite di *H. perforatum* per il trattamento della depressione lieve e moderata ha dimostrato efficacia in numerosi studi e meta-analisi (Linde *et al* 2008, Kasper *et al* 2010, Bombardelli e Morazzoni 1995, WHO 2002, Ph.Eur 2010, Suntar *et al* 2010). Tuttavia, non c'è un generale consenso su quali siano i composti chimici (ipericine, iperforina, flavonoidi) principalmente preposti a tale attività (Bombardelli e Morazzoni 1995, Chatterjee *et al* 1998, WHO 2002, Butterweck e Schmidt 2007), e l'attività antidepressiva delle formulazioni a base di *H. perforatum* può essere attribuita a diverse classi di metaboliti secondari, che presentano effetti additivi, sinergici e in parte antagonisti (Butterweck e Schmidt 2007). Gli studi più recenti indirizzano tale capacità verso la molecola dell'iperforina (Zanoli 2004) anche se altrove si sottolinea l'importanza dell'impiego dell'estratto nel suo complesso; pertanto, allo stato attuale delle conoscenze

scientifiche, è l'estratto totale a dover essere considerato come il principio attivo (Beerhues 2011).

Negli ultimi anni anche gli studi sulla valutazione dell'attività biologica degli oli essenziali estratti da molte specie del genere *Hypericum* hanno confermato significative proprietà antimicrobiche ed antifungine, che lasciano intravedere come nel futuro l'iperico possa diventare un'importante fonte di oli essenziali (Bertoli *et al* 2011).

Nella complessa miscela dei metaboliti secondari della specie, numerosi altri componenti risultano importanti a fini terapeutici; tra questi, sono da sottolineare per la loro attività anche i polifenoli (rutina, hyperoside, isoquercitrina, quercitrina, quercetina) e gli acidi fenolici (ac. clorogenico, ac.caffeico) (Ghavamaldin *et al* 2012). Le ampie e disparate proprietà medicinali di *H. perforatum* sono molto ben riassunte nel lavoro di Rammal *et al* (2009): antiossidante, analgesica, anticonvulsiva, ansiolitica, antinfiammatoria, antitumorale, antibatterica, antivirale, antiHIV, neuroprotettiva, epatoprotettiva antiretrovirale e ovviamente antidepressiva, a ulteriore dimostrazione delle enormi potenzialità di questa pianta medicinale.

- Importanza economica

Tra le specie del genere *Hypericum* impiegate nel mondo, *Hypericum perforatum* è senza dubbio la più apprezzata ed è attualmente considerata come una delle piante più interessanti da un punto di vista economico poiché ha completato con successo la transizione da pianta infestante e/o raccolta in natura a pianta posta in coltivazione (Carrubba *et al* 2010). Grazie alla sua popolarità ed efficacia e alla sua posizione di mercato viene considerata negli ultimi anni una delle erbe “best-seller”: negli Stati Uniti dal 1995 al 1997 ha incrementato le vendite annuali da 20 a 200 milioni di dollari, e nel 1998 il suo valore di mercato ha superato i 570 milioni di US \$ in tutto il mondo. Diverse centinaia di ettari coltivati a tale specie sono oggi disponibili in Europa, dove la domanda di mercato per l'erba grezza nel 1999 è stata di 5.000 t (Bruni e Sacchetti 2009).

Nel 2008 è stato tra i primi 10 integratori a base d'erbe venduti in USA con un fatturato di 8,2 milioni di dollari e nel 2004 ha rappresentato circa il 13% di tutti i prodotti a base d'erbe venduti in Europa, di cui 70 milioni di euro solo in Germania. Proprio la Germania è il paese europeo in cui l'iperico concentra le sue principali aree produttive, con più di 600 ha nel 2003 (Crockett e Robson 2011). In Europa, le aree di produzione primaria di *H. perforatum*, inteso come droga grezza, sono in Germania, Italia e Romania, mentre la produzione di erba grezza indirizzata verso la produzione di olio essenziale, prodotto

divenuto solo di recente disponibile su più ampia scala, deriva in gran parte da piccole aziende dislocate in Serbia, Croazia, Polonia, Bulgaria, Francia, Canada e Stati Uniti (Crockett 2010).

Oggi l'importanza del settore erboristico-farmaceutico spinge le multinazionali ad investire in maniera consistente nel mercato erboristico aumentando le possibilità di utilizzazione delle piante, intese come elementi primari della medicina naturale e degli integratori alimentari. Nell'ambito delle sostanze naturali si possono infatti individuare tre tipologie di prodotti:

- i fitoterapici, fitomedicine e medicine tradizionali a base di erbe; sono farmaci a tutti gli effetti, con principio attivo di origine vegetale, ufficialmente approvati dal Ministero della Salute che ne verifica la qualità, e vendibili esclusivamente in farmacia, dietro presentazione di ricetta medica o come farmaci da banco (prodotti medicinali finiti);
- i prodotti erboristici, formulazioni a base di piante, loro parti e derivati, non addizionati con prodotti di sintesi o emisintesi, diversi da medicinali, integratori alimentari, prodotti cosmetici, prodotti aromatici e coloranti; in generale si tratta di prodotti aventi finalità salutistiche, intesi quindi a favorire lo stato di benessere dell'organismo umano o animale;
- gli integratori alimentari, collocati in un ambito compreso tra gli alimenti di tipo classico ed i prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare. La Direttiva 2002/46/CE li definisce come “prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare ma non in via esclusiva aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti sia pluricomposti, in forme predosate”, stabilendo così che gli estratti di origine vegetale possono rientrare anche nella categoria degli integratori alimentari.

La Direttiva del Parlamento Europeo 2004/24/CE del 31 marzo 2004, nel recepire questa definizione, istituisce una speciale categoria di “medicinali vegetali tradizionali” (Federici *et al* 2005).

Seppure di diverso peso economico anche il settore florovivaistico riveste una certa importanza come attività produttiva agricola, e molti sono i prodotti del genere *Hypericum* che si possono trovare nei cataloghi commerciali online di aziende vivaistiche. Svariate specie di *Hypericum* e/o loro ibridi e cultivar sono conosciute, apprezzate e

commercializzate in molte parti del mondo per la loro valenza ornamentale. L'aspetto estetico può riguardare l'appariscenza e l'abbondanza della fioritura (come ad es. per *Hypericum moserianum* (*H. calycinum* x *H. patulum*) e *Hypericum* 'Hidcote' (*Hypericum* x *cyathiflorum* 'Gold Cup' x *H. calycinum*) (Nurk, 2011), o la bellezza e il colore del fogliame (*H. androsaemum*) o dei frutti (*Hypericum inodorum* 'Magical Beauty', *Hypericum inodorum* 'Magical White', *Hypericum inodorum* 'Magical Red Star') (hypericum online).

Anche in questo settore si possono ottenere nuovi “prodotti” e quindi interessanti prospettive commerciali.

1.4 PRODUZIONE

A fronte della forte richiesta di derivati da *Hypericum* la disponibilità commerciale appare piuttosto limitata e spesso di origine incerta. La raccolta a partire dai popolamenti naturali, su cui si basa la maggior parte del reperimento di materie prime vegetali, non può certamente essere considerata una pratica sostenibile: troppe le implicazioni ecologiche e altrettanto significative le richieste di caratteristiche qualitative stabili che possono essere soddisfatte solo attraverso il potenziamento della messa in coltura di tali essenze vegetali (Schippmann *et al* 2002, Carrubba *et al* 2008). La possibilità di introduzione di alcune specie di *Hypericum* negli ordinamenti colturali mediterranei, come specie agrarie o anche come specie di interesse floricolo-ornamentale, è senz'altro potenzialmente assai interessante, ma richiede ancora la definizione di numerosi aspetti relativi alle tecniche di produzione. Il loro perfezionamento permetterebbe di ottimizzare le rese sia sul piano della quantità che della qualità rispettando, al contempo, il criterio della massima efficienza nell'uso delle risorse produttive.

- Miglioramento della qualità

La qualità fitochimica di una pianta influisce fortemente sulla qualità chimica degli estratti che da essa possono derivare e questo aspetto riveste un'importanza cruciale nel caso di piante medicinali. Si deve perciò tendere ad ottimizzare tutti i fattori che contribuiscono all'ottenimento di caratteristiche qualitative elevate, nel senso di volta in volta definito sulla base delle richieste delle industrie farmaceutiche. A questo scopo occorre un approccio integrato dei settori scientifici coinvolti, l'agronomico, il tecnologico ed il genetico. Anche se il breeding di tipo classico appare la via di miglioramento preferibile (maggiore resistenza ai patogeni, maggiore resa produttiva e più elevato contenuto in componenti chimiche desiderate) anche gli aspetti tecnologici ed agronomici sono molto importanti (Poutaraud e Girardin 2005).

Bruni e Sacchetti (2009) pongono al riguardo alcune domande molto interessanti:

- perché i prodotti sono così spesso diversi nella loro composizione ed efficacia?
- quale approccio è il più adatto per aumentare la produttività biochimica delle piante medicinali su larga scala, con soluzioni *low cost*?
- il profilo fitochimico di una pianta medicinale può essere modulato in modo da aumentare l'accumulo dei suoi componenti più importanti?

Fornire una risposta a tali domande è un compito estremamente difficile, a causa del gran numero di variabili in gioco: chemiodiversità intraspecifica, coltivazione delle piante,

stadio ontogenetico, gestione post-raccolta, fattori biotici e abiotici, per citarne solo alcuni. Un percorso ideale in questa direzione dovrebbe includere ad esempio la definizione delle condizioni ottimali di pre-raccolta e post-raccolta e quindi l'applicazione di specifiche Buone Pratiche Agricole (GAP) centrate sulla valorizzazione del metabolismo secondario. Per trasformare le colture medicinali in materie prime ricche in biometaboliti, migliorando la qualità per i beneficiari finali e, non ultimi, i profitti per i coltivatori, la tendenza emergente suggerisce un approccio integrato e sinergico. Agronomia e genetica devono sviluppare strategie di allevamento tenendo conto delle acquisizioni ottenute dalla fitochimica, dalla biochimica, dalla farmacognosia e dalla farmacologia, senza perdere di vista l'equilibrio economico della produzione.

L'industria richiede prioritariamente il controllo sulla qualità del farmaco, fattore a cui contribuiscono elementi diversi: purezza del materiale grezzo, bassa contaminazione batterica e chimica, alta concentrazione dei componenti attivi. Ogni fase della produzione, dalla raccolta all'estrazione della materia prima, incluse quindi la scelta delle accessioni da impiegare, le pratiche agricole, le tecniche di post-raccolta e di immagazzinamento, esercita sulla qualità un impatto di cui occorre conoscere l'entità, sia isolatamente che in combinazione con gli altri fattori.

La qualità chimica corrisponde in primo luogo ad una chiara identificazione dei componenti attivi; tuttavia, la complessità dell'estratto rende difficile la standardizzazione dell'"*Hyperici herba*". Fino a questo momento, la Farmacopea Europea si basa sui soli contenuti in ipericina e pseudoipericina (naftodiantroni). Dal punto di vista della qualità commerciale è necessaria una quantità minima di ipericina pari allo 0,04% (Wagner e Bladt 1994), mentre i comuni estratti contengono in realtà concentrazioni in ipericine oscillanti dal 0,05% allo 0,3% (Karioti e Bilia 2010). Le discrepanze che si riscontrano tra i diversi risultati analitici dovrebbero far riflettere su quali siano stati i protocolli analitici impiegati (Saxena *et al* 2007). La Farmacopea europea e statunitense stanno proponendo una diversa standardizzazione basata simultaneamente sulla concentrazione di ipericine, iperforina e flavonoidi, più corretta, probabilmente, di quella attuale basata sulle sole ipericine.

- Tecniche agronomiche

La concentrazione dei componenti attivi nella pianta varia in funzione sia di fattori endogeni (varietà o biotipo impiegati) che esogeni (condizioni climatiche, fertilità del suolo, momento della raccolta). Poiché l'agrotecnica interviene sull'ambiente di crescita

delle piante, è ragionevole attendersi che la scelta della pratica agricola da adottare possa modificare, in misura talvolta significativa, la biosintesi e l'accumulo dei metaboliti attivi (Carrubba e Catalano 2009). Su questo argomento, le informazioni disponibili in letteratura sono ancora poche (Poutaraud e Girardin 2005). La recente pubblicazione di Kizil *et al* (2013), ad esempio, mette in luce la correlazione tra resa produttiva (in peso secco) e contenuto in ipericina con i diversi stadi di sviluppo della pianta (periodo di pre-fioritura, piena fioritura e post-fioritura), ma soprattutto con l'età della pianta (secondo e terzo anno) e con l'altezza di taglio applicata. Altri lavori prendono in considerazione i risultati ottenuti applicando diverse tecniche agronomiche e riferendosi come prodotto finale al contenuto in ipericine dell'erba secca (Berti *et al* 2000, Briskin *et al* 2001, Zubek *et al* 2012, Bruni *et al* 2005).

Negli USA i più noti indicatori commerciali del valore della droga di *H. perforatum* convergono verso la conclusione che dalla produzione si possono ricavare da 2.000 a 3.000 dollari per acro (6.000 \$/ha), purchè la biomassa raccolta sia ricca in ipericina (Becker 2000). Di conseguenza si sta compiendo un grande sforzo verso il miglioramento della gestione della coltivazione in campo, al fine di massimizzare il rendimento e la quantità di costituenti fitochimici considerati responsabili delle proprietà terapeutiche della pianta. In Europa, le varietà più comunemente coltivate di *H. perforatum* sono "Topas", "Anthos", "Elisir", "New Stem", che però non sempre soddisfano i requisiti qualitativi e quantitativi di mercato (Bruni e Sacchetti 2009).

- Prospettive

Dai lavori fin qui esaminati si può comprendere come le prospettive a favore di un miglioramento della produzione siano ampie. Tuttavia, sono necessari ancora molti sforzi per ottimizzare i protocolli di coltivazione o per ampliare la gamma dei genotipi impiegati. Nuovi traguardi si possono raggiungere relativamente alla resistenza ai patogeni o alla standardizzazione degli estratti e tutti i campi scientifici sono chiamati a questo impegno.

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Questa ricerca ha avuto come obiettivo finale la definizione e l'approfondimento di strategie volte alla valorizzazione del germoplasma del genere *Hypericum*, con particolare riguardo a quello di origine siciliana.

A tale scopo nel corso del triennio di dottorato sono stati affrontati i seguenti aspetti:

1. la caratterizzazione botanica e chimica di alcune specie e la valutazione della loro variabilità inter- e intraspecifica;
2. l'individuazione di una strategia ottimale di propagazione;
3. l'elaborazione di un protocollo ottimale di coltivazione;
4. l'individuazione delle potenzialità di utilizzo nell'ambito florovivaistico.

Durante il primo anno è stata effettuata una approfondita indagine bibliografica, propedeutica alla ricerca, orientata verso tre linee di osservazione: 1) la caratterizzazione botanica, morfologica e di distribuzione e diffusione delle specie; 2) lo studio delle loro principali caratteristiche agronomiche (riproduzione, coltivazione); 3) lo studio delle loro caratteristiche biochimiche e funzionali. Parallelamente all'indagine bibliografica, è stata avviata un'attività di ricerca e collezione del maggior numero possibile di genotipi di *Hypericum*, da moltiplicare per seme, in modo da poter disporre di quantitativi di fitomassa sufficienti per l'esecuzione delle prove successive. È stata avviata una prova di micorrizzazione su colture in vaso ed una prova preliminare sugli effetti della luce e della temperatura sull'epoca di fioritura.

Nel secondo anno è proseguita l'attività di raccolta di materiale vegetale (cime fiorite, semi) di vecchie e nuove accessioni, per effettuare l'analisi degli estratti vegetali e permettere la caratterizzazione fitochimica delle diverse accessioni unitamente alla caratterizzazione molecolare, tramite la tecnica del DNA-barcoding.

Lo studio degli aspetti relativi all'agrotecnica è stato approfondito attraverso prove di valutazione delle tecniche di propagazione agamica, dell'applicazione della micorrizzazione unitamente alla concimazione fosfatica su colture in vaso, della tolleranza alla salinità, della produttività quali-quantitativa con prove di coltivazione di accessioni diverse, e della valenza estetica con prove di acclimatamento di specie ornamentali.

Nel terzo anno la ricerca è continuata con l'acquisizione di nuove accessioni per ampliare la quantità di materiale vegetale disponibile, con la messa in coltura dei nuovi biotipi reperiti, con la creazione di una banca del germoplasma *ex-situ* attraverso la messa a

dimora di singoli individui per ciascuna accessione (piante madri) e la collezione dei loro semi. Sono proseguite inoltre le prove di coltivazione in ambienti diversi, le analisi chimiche degli estratti da cime fiorite per il confronto inter ed intraspecifico e le prove sull'attitudine estetico-ornamentale.

Gli studi svolti confermano in maniera univoca l'esistenza all'interno del genere *Hypericum* di un'ampia variabilità morfologica e chimica, finora esplorata solo parzialmente ed in attesa di una sua piena ricognizione e valorizzazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CARATTERIZZAZIONE DEL GERMOPLASMA

3.1.1 Raccolta e conservazione materiale vegetale e semi

L'indagine bibliografica in questo caso si è orientata verso la ricerca di fonti bibliografiche riguardanti la caratterizzazione botanica, morfologica e della distribuzione e diffusione delle specie di *Hypericum* nella penisola italiana e in Sicilia.

Parallelamente, è stata avviata un'attività di ricerca e collezione del maggior numero possibile di genotipi, da moltiplicare per seme, così da poter disporre di quantitativi di fitomassa sufficienti per l'esecuzione delle prove successive.

L'attività di raccolta del materiale di propagazione (semi) si è svolta nel corso dell'intero triennio, facendo riferimento alle modalità contenute nel Manuale A.P.A.T. per la raccolta, studio, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma (A.P.A.T. 2006). Al fine di ampliare la base genetica disponibile, semi del genere *Hypericum*, provenienti anche da altri ambienti sono stati richiesti a tutti gli Orti e Giardini botanici italiani che riportassero nell' *Index seminum* la loro disponibilità. A fine triennio si è potuto così disporre di un ricco patrimonio di entità tassonomiche (tab. 4.1.1.1).

In base alle segnalazioni storiche delle localizzazioni fatte in Sicilia sono state compilate, specie per specie, una mappa dei probabili siti di rinvenimento ed un calendario delle fioriture, per programmare l'attività di ricognizione e di reperimento (Castellano e Spadaro 2010, Conti *et al* 2005, Gianguzzi *et al* 2011, Giardina *et al* 2007, Giardina 2010, Pignatti 1982).

Le escursioni sono iniziate nel 2012 e sono proseguite nel biennio successivo, nei mesi di maggio - luglio (momento della fioritura) e di settembre - ottobre (momento della raccolta dei semi), interessando le province di Trapani, Palermo, Messina e Agrigento in diverse fasce altimetriche.

Altre escursioni si sono svolte in Toscana nell'Appennino tosco-romagnolo, all'interno del Parco delle Foreste Casentinesi, sito naturalistico e floristico di grande rilevanza, nelle province di Arezzo e Firenze.

Le escursioni iniziate nel mese di maggio, per permettere il riconoscimento certo delle specie possibile solo in presenza dei fiori, sono state ripetute fino alla fine di settembre per consentire anche una puntuale descrizione del calendario di fioritura delle piante in natura e delle caratteristiche dell'areale di vegetazione. Nelle località in cui la vegetazione si distingueva per omogeneità e abbondanza delle popolazioni, nei mesi di giugno- luglio (in

funzione della specie reperita), si sono prelevati campioni di materiale vegetale (cime fiorite e apici vegetativi) da sottoporre alle successive analisi fitochimiche e genetiche. Nei mesi di agosto- ottobre, in alcune delle stazioni di prelevamento e limitatamente ad alcune accessioni, è stato possibile raccogliere il seme, successivamente messo a dimora.

I punti di raccolta del materiale vegetale, particolarmente nei casi in cui lo stesso doveva venire destinato alle analisi genetiche, sono stati identificati tramite coordinate GPS (Garmin e-trex 30), dati stazionali e fotografie. Sono stati poi riportati in cartografia così da consentire le eventuali successive localizzazioni.

Sia nel caso dei biotipi reperiti in natura che di quelli pervenuti dai diversi Orti e Giardini Botanici nazionali, i semi man mano raccolti o ricevuti si trovavano in larga parte ancora racchiusi all'interno delle capsule, ed è stato quindi necessario procedere alla loro estrazione e ripulitura, per consentirne la selezione e la conservazione. I semi puliti sono stati fotografati, pesati, annotando le prime peculiarità distintive, e conservati in appositi contenitori, andando così a costituire una banca dei semi. Le semine hanno avuto inizio nel giugno 2012 e si sono ripetute nelle due primavere successive. Le piante adulte via via ottenute sono state utilizzate per costituire una collezione di piante madri, così da conservare il germoplasma reperito, per prove di coltivazione a fini produttivi e a fini analitici.

3.1.2 Descrizione botanica e habitat

Le principali informazioni sulla botanica delle diverse specie sono state ricavate dalla ricca bibliografia specifica disponibile (Castellano e Spadaro 2010, Conti *et al* 2005, Giardina *et al* 2007, Giardina 2010, Pignatti 1982) e integrate tramite i rilievi e le descrizioni *in situ* dei biotipi reperiti e dei rispettivi habitat di reperimento. È stato così possibile redigere delle schede descrittive, specie-specifiche, in cui sono stati rielaborati alcuni dei caratteri morfologici distintivi utilizzati da



Capo Gallo (PA)
Sito di reperimento di *H. perforatum* e *H. perfoliatum*

Crockett e Robson (2011) per la classificazione tassonomica (*habit*, *indumentum*, *glands*, *stem*, *leaves*, *sepals*, *petals*, *stamen fascicles* and *stamens*, *styles* and *placentae*, *fruit* and

seeds).

Il genere *Hypericum* è uniformemente distribuito in tutta la flora siciliana occupando habitat assai diversificati, dalle zone costiere, aride e soleggiate, a quelle riparie più umide, fino a quelle boscate e montane. Le specie su cui si è indagato sono 10, cioè tutte quelle riscontrabili sul territorio siciliano, ma di queste solo 6 sono state individuate, raccolte e studiate.



Mazara (TP) sito di reperimento di *H. pubescens*

Nella penisola italiana il genere *Hypericum* è altrettanto ben distribuito, ma con unità

tassonomiche non sempre corrispondenti a quelle presenti in Sicilia. In Italia si possono trovare 26 specie con 4 sottospecie; le unità indagate nell'ambito del presente lavoro sono 11, unicamente quelle che è stato possibile reperire in natura o ottenere dai giardini e orti botanici nazionali.



Floresta (ME) sito di reperimento di *H. tetrapterum*

3.1.3 Caratterizzazione chimica

Come già accennato, nell'estratto di *Hypericum* sono presenti numerosi metaboliti secondari. Nürk (2011) riporta come più noti i naftodiantroni (ipericina e pseudoipericina), pigmenti rossi accumulati nelle ghiandole scure (Zobayed *et al* 2006), i derivati del floroglucinolo (iperforina e adiperforina), fotosensibili e instabili, che si accumulano nelle ghiandole traslucide (Soelberg *et al* 2007) degli organi riproduttivi, gli xantoni, una classe di sostanze prodotte in maggiore quantità nelle radici, ed i flavonoidi, anche se a fini pratici il vero componente attivo dell'Erba di S. Giovanni dovrebbe essere considerato l'estratto totale, come suggerito da Butterweck e Schmidt (2007). In molti lavori viene adottato un approccio tassonomico, correlando i caratteri morfologici delle specie con il loro contenuto in metaboliti secondari (Crockett e Robson 2011). Non è facile accertare

quanto di questa variabilità sia dovuta a differenze reali tra i genotipi e quanto sia dovuto a differenze nei metodi di analisi, di gestione o di condizionamento del materiale vegetale impiegato nelle diverse sperimentazioni. Una migliore comprensione delle cause di tale variabilità dovrebbe comportare la delucidazione delle ragioni per le quali il genere *Hypericum* produce i propri metaboliti secondari. Una teoria interessante, sicuramente meritevole di ulteriore approfondimento, suggerisce che le piante sintetizzano tali composti in risposta a diversi agenti di stress, come il sale e la siccità (Selmar 2008) o l'attacco da parte di erbivori (Sirvent *et al* 2002).

La determinazione quanti-qualitativa dei metaboliti secondari presenti nelle accessioni reperite nel corso del triennio ha avuto l'obiettivo di effettuare una più precisa caratterizzazione del germoplasma autoctono, permettendone anche il confronto con le stesse specie provenienti da altre parti d'Italia. A questo scopo, in ogni accessione è stato rilevato il contenuto totale in ipericine (ipericina e pseudoipericina) ed iperforina, verificandone la qualità chimica.

La raccolta ha interessato le sommità fiorite (15-20 cm) degli individui in fase di piena fioritura, e si è sempre svolta secondo modalità standard, nelle ore centrali della giornata, con cielo sereno, riponendo il materiale in sacchetti di carta che ne permettessero la traspirazione. Successivamente i campioni sono stati messi ad essiccare in ambiente asciutto, ad una temperatura di 20 - 25 °C ed in assenza di fonti di luce, particolare di estrema importanza data la ben nota rapida degradabilità alla luce delle molecole di interesse.

I campioni così preparati sono stati inviati ai laboratori del CNR-ICB (Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Chimica Biomolecolare) di Valverde (CT) per l'esecuzione delle analisi chimiche.

A questo scopo, circa 5 g di materiale vegetale essiccato all'aria venivano sminuzzati, omogeneizzati e sottoposti ad estrazione in 50 ml di etanolo a temperatura ambiente per 72 ore, al buio e sotto costante agitazione. L'estratto veniva filtrato con carta da filtro di idonea porosità ed il filtro lavato tre volte con aliquote da 10 ml di etanolo ciascuna. In seguito la miscela ottenuta veniva portata a secco con evaporatore rotante, così da calcolare la resa percentuale in estratto secco di ciascun campione. Successivamente venivano condotte le analisi con HPLC (HPLC-DAD Thermoscientific Ultimate-3000), in triplicato, iniettando 20 microL di una soluzione 10mg/mL in metanolo "HPLC grade VWR" per ciascun estratto.

La quantificazione del contenuto in sostanze attive è stata condotta mediante analisi

cromatografica utilizzando il metodo dello standard esterno, registrando le assorbanze rispettivamente a 287 nm per l'Iperforina e 590 nm per Pseudoipericina e Ipericina.

3.1.4 Caratterizzazione molecolare

L'identificazione tassonomica di tipo classico, basata sulla caratterizzazione morfologica, in alcuni casi non offre la certezza dell'identificazione della specie. Pur con una buona conoscenza della botanica sistematica e dei caratteri strutturali e dimensionali distintivi di ciascun *taxon* (fiori, frutti, foglie, ecc.) va tenuto conto che non sempre queste strutture sono valutabili a causa di variazioni morfologiche legate alla stagionalità, alla fenologia delle piante e alle condizioni ambientali. La tassonomia moderna recentemente si avvale con successo anche delle analisi molecolari. A questo scopo si è voluto applicare il DNA-barcoding (“codice a barre del DNA”) quale tecnica integrativa per l'identificazione tassonomica delle specie oggetto di studio. Questo nuovo sistema di identificazione, nato nel 2003 (Hebert *et al* 2003), fornisce la possibilità di avere un unico identificatore diagnostico per le differenti specie viventi, sia animali che vegetali.

L'efficacia dell'approccio del DNA-barcoding nell'identificazione degli organismi si basa sull'analisi della variabilità all'interno di una regione genomica nota e standardizzata, e quindi sulla costituzione di un ampio e robusto dataset molecolare, come base di confronto dei segmenti di DNA ottenuti. Nel procedimento si uniscono analisi molecolare (molecolarizzazione) e informatizzazione della tassonomia, vero cuore del DNA-barcoding, così da generare dei database estesi, in cui tassonomia tradizionale, molecolare, biogeografia e altre informazioni si integrino. Ciò è possibile grazie alla standardizzazione del metodo, così che uno stesso laboratorio può unificare il modo di raccogliere e collezionare gli organismi, estrarre, amplificare e sequenziare il DNA e analizzare i dati, da inserire poi in un'unica banca dati mondiale. Per le piante, i protocolli del DNA-barcoding fanno riferimento alle indicazioni del Plant Working Group, che suggerisce l'impiego di un approccio *multilocus* (Hollingsworth *et al* 2011, Fazekas *et al* 2008).

A seguito di queste considerazioni ci si è avvalsi anche per il genere *Hypericum* di tale classificazione botanica integrata, così da conseguire certezza identificativa delle specie reperite.

In accordo con i protocolli indicati dal gruppo di lavoro CBOL (Consortium for the Barcode of Life) Plant Working Group (Hollingsworth *et al* 2011) sono state amplificate e sequenziate due regioni plastidiali codificanti, *matK* e *rbcL*, più una terza regione plastidiale non codificante (*trnH-psbA* intergenic spacer) considerata ipervariabile. Il DNA

è stato estratto a partire da foglioline liofilizzate, in tre replicati biologici, con protocollo CTAB (Doyle e Doyle 1987).

I prodotti sono stati purificati e sequenziati bidirezionalmente secondo la procedura di sequenziamento Sanger per AB3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati sottoposti a screening di eventuali errori e assemblati in contigs utilizzando il software Sequencer 4.10 (Gene Codes Corporation, USA). Gli allineamenti di sequenza sono stati eseguiti da MUSCLE ed è stato generato un albero filogenetico Neighbour-Joining per ciascun marker (indicatore), sulla base del modello Kimura (1980) a due parametri utilizzando il software Mega 6 (Tamura *et al* 2013). L'identificazione molecolare è stata ottenuta con il confronto delle sequenze, comprese quelle disponibili presso banche-dati internazionali (BOLD/NCBI). La performance di ciascun indicatore è stata valutata in termini di PCR e sequenziamento avvenuto, qualità della sequenza, successo di identificazione a livello specie o sottospecie (risoluzione a livello delle specie) e livello di distanza genetica (K2P value %).

È stata, quindi, condotta l'analisi filogenetica per definire il livello di variabilità genetica supportato da ciascun marcatore molecolare.

La banca del DNA e la collezione *ex-situ* delle specie indagate (*H. aegypticum*, *H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. hircinum* subsp. *majus*, *H. perfoliatum*, *H. perforatum* subsp. *perforatum*, *H. perforatum* subsp. *veronense*, *H. pubescens*, *H. tetrapterum*, *H. triquetrifolium*) sono conservate presso il CRA-SFM di Bagheria.

3.2 STUDIO DI ALCUNI ASPETTI DELL'AGROTECNICA

Al fine di predisporre specifici protocolli di coltivazione dell'iperico, validi e riproducibili negli ordinamenti colturali degli ambienti mediterranei, e considerando la scarsità di informazioni reperibili in letteratura sull'argomento, si è ritenuto opportuno sviluppare la ricerca predisponendo delle prove sperimentali preliminari riguardanti le principali tecniche di propagazione, gamica e agamica, dell'iperico, focalizzando l'attenzione sulla specie *Hypericum perforatum* di cui si aveva una maggiore disponibilità di sementi e di informazioni, e reputata quale pianta “di riferimento” o “modello” per il genere *Hypericum* a livello mondiale.

3.2.1 Moltiplicazione gamica

Dell'iperico sono ben note le basse percentuali di germinabilità del seme (Perez-Garcia *et al* 2006, Camas e Caliskan 2011), attribuite ad una certa difficoltà ad interrompere la

fase di dormienza. La dormienza è un processo fisiologico per cui un seme non germina se non sottoposto a trattamenti specifici, tra cui un prolungato periodo di basse temperature (vernalizzazione). Tale caratteristica è sotto stretto controllo genico e rappresenta un'importante strategia di escaping alle basse temperature, risultando quindi particolarmente importante nelle specie mediterranee a crescita primaverile-estiva, come il genere *Hypericum*. Nei semi con più marcata esigenza in freddo, la vernalizzazione innesca una serie di reazioni biochimiche interne al seme che portano all'attivazione di enzimi che degradano gli inibitori della germinazione (Chouard 1960).

Mentre la fisiologia del fenomeno della dormienza nel seme di iperico è stata oggetto di poche sperimentazioni specifiche, uno tra i più studiati fattori ambientali responsabili di variazioni nel tasso di germinazione è la temperatura di incubazione del seme. Campbell (1985) ha riportato una riduzione della germinazione dell'iperico all'incrementare delle temperature. Al contrario, Perez-Garcia *et al* (2006) non hanno osservato alcuna variazione della germinazione in 3 diverse accessioni di iperico incubate a 15 °C e 25 °C, ma hanno al contempo rilevato una notevole riduzione del tempo medio di germinazione nelle tesi sottoposte a temperatura più alta.

Per quanto riguarda il substrato di coltura, alcuni Autori hanno riportato buone percentuali di successo nella germinazione *in vitro* di alcune specie di *Hypericum* e nella successiva crescita delle piante utilizzando il mezzo di Murashige e Skoog (Ayan e Cirak 2007; Cirak *et al* 2007; Oluk e Orhan 2009) o in piastre Petri, pre-trattando con un acido debole o con acido gibberellico (Cirak 2007); tuttavia, si evidenzia la necessità di approfondire l'argomento, estendendo l'attività sperimentale anche ad altre specie, in particolare endemiche (Nürk e Crockett 2011).

Infine, un fattore potenzialmente di grande interesse nello studio delle dinamiche relative alla germinazione dei semi è quello dell'interazione tra questi e alcuni ceppi batterici o fungini. Numerosi lavori hanno mostrato che alcuni microrganismi del suolo possono avere un effetto importante sul meccanismo di germinazione dei semi. Ad esempio, Delgado-Sánchez *et al* (2011) hanno dimostrato che i funghi svolgono un ruolo determinante nell'incrementare il tasso di germinazione dei semi di *Opuntia streptacantha*, una specie desertica. Gli stessi autori hanno inoltre mostrato che la sterilizzazione del seme ostacola drasticamente la germinazione, in quanto rimuove i microrganismi del suolo che riducono la durezza del seme e quindi facilitano la fuoriuscita della prima radichetta. Nel caso dei funghi, Delgado-Sánchez *et al* (2011) hanno attribuito tali effetti alla capacità di questi microrganismi di secernere enzimi idrolitici capaci di attaccare il tegumento del seme.

Al contrario dei funghi, i batteri raramente producono enzimi in grado di idrolizzare la cellulosa o la lignina; alcuni lavori hanno tuttavia mostrato che la secrezione di acidi organici e di composti con attività biologica può contribuire, da un canto, ad allargare le maglie dei reticoli cellulosici e quindi facilitare l'imbibizione del seme, e dall'altro a stimolare o ridurre, secondo i casi, il vigore del germinello (Glick *et al* 1994). Un effetto positivo sulla germinazione è stato attribuito anche alla produzione di proteine "antifreeze", che riducono gli effetti del freddo sull'attività dell'acqua nel suolo e quindi favoriscono l'imbibizione del seme (Glick *et al* 1994).

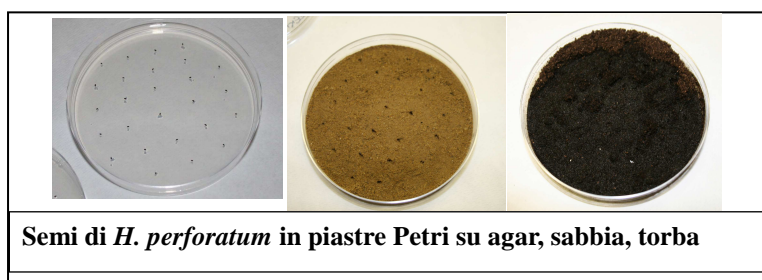
In considerazione della scarsità di informazioni riguardanti specificatamente i meccanismi di germinazione dei semi nel genere *Hypericum*, nonché degli accorgimenti eventualmente adottabili per facilitare il processo, si sono voluti approfondire alcuni aspetti della propagazione gamica, verificando in particolare le migliori condizioni di germinazione del seme di una accessione siciliana di *Hypericum perforatum*. Sono state pertanto svolte specifiche prove *in vitro*, e sono stati studiati gli effetti sulla germinazione del seme di variabili diverse, tra cui temperatura, substrato, soddisfacimento delle esigenze in freddo e carica batterica.

- Germinazione *in vitro*

Le prime prove di germinazione sono state condotte *in vitro*, su semi di *H. perforatum* provenienti dall'azienda sperimentale "Sparacia" (Cammarata - AG), disponibili in gran quantità fin dai primi mesi dell'attività di dottorato.

Metà dei semi è stata sottoposta a vernalizzazione esponendo i campioni a 4-5 °C per 2 settimane. La semina è stata effettuata in piastre Petri del diametro di 10 cm, contenenti ciascuna 2 dischi di carta da filtro, precedentemente sterilizzate mediante esposizione ad UV per 30 minuti. I semi invece sono stati sterilizzati tramite immersione in ipoclorito di Na al 3 % per 1-2 min, sciacquati 3 volte con acqua distillata sterile ed infine posizionati sui dischi di carta da filtro. Le piastre erano 5 per tesi con 20 semi per piastra (100 per ogni tesi). I dischi di carta sono stati inumiditi con 2 ml di acqua distillata sterile per piastra. Tutte le tesi sono state collocate in armadi termostatati e al buio. Così come suggerito in

bibliografia (Perez-Garcia *et al.* 2006), sono state adottate temperature di 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C. I rilievi sono



stati effettuati ogni tre giorni, per tre settimane.

L'esecuzione della seconda prova è stata effettuata ponendo a confronto, secondo uno schema sperimentale con 7 ripetizioni, i seguenti 2 trattamenti e le loro combinazioni:

- 1) substrato di coltura: torba, sabbia, agar;
- 2) presenza di microrganismi nel substrato: substrato non sterilizzato, substrato sterilizzato, substrato sterilizzato + inoculo di *Pseudomonas fluorescens* [+Pf].

La combinazione agar non sterilizzato non è stata inserita per ovvia irrealizzabilità del substrato.

Ogni capsula Petri (unità sperimentale) è stata riempita con il substrato selezionato (rispettivamente, 1,5 g di torba, 7,6 g di sabbia, o 20 ml di agar-acqua), quindi le tesi per cui era prevista la sterilizzazione sono state sottoposte a trattamento con raggi UV per 30 minuti. In ogni capsula sono stati deposti 25 semi di *H. perforatum* previamente vernalizzati, e successivamente inumiditi. Le tesi che prevedevano inoculo di *P. fluorescens* (ceppo 6506) hanno ricevuto 5 ml di dispersione del batterio in acqua distillata e deionizzata.

Il set sperimentale è stato replicato due volte, ponendo ogni serie di capsule a temperature rispettivamente di 15 e 25 °C. La germinazione nelle diverse tesi è stata valutata a cadenze prestabilite.

- Germinazione *in vivo*

È stato svolto un test preliminare per confrontare la risposta germinativa su terra di semi vernalizzati e non vernalizzati, sottoposti ad identiche condizioni ambientali. La tesi con semi non vernalizzati ha espresso livelli di germinazione inferiori al 5 %, confermando la validità dei risultati ottenuti nelle prime prove di germinazione *in vitro*. Si è deciso

quindi di applicare un pretrattamento di vernalizzazione (semi nudi conservati in contenitori, collocati per 2 settimane a 4-5 °C) dei semi di tutte le specie su cui si intendeva lavorare.

I semi vernalizzati sono stati collocati in plateaux alveolati di polistirolo forati alla base, riempiti



H. perforatum 1° travaso in vasetti 7x7cm

con un substrato standard, costituito da 60% torba, 20% sabbia e 20% perlite (in volume) e posti a gruppi di 3-4 semi per ogni alveolo. Una volta giunta ad un accrescimento di 6-8 nodi le piantine venivano successivamente spostate in vasetti (7x7 cm) riempiti con il medesimo terriccio e sistemate all'interno di un ombraio (50% di ombreggiamento, altezza 4 m).

Le semine sono state effettuate presso l'azienda sperimentale del CRA di Bagheria (PA) a partire dal marzo 2012 e proseguite negli anni successivi.

I bancali all'interno della serra erano provvisti di riscaldamento basale, per stimolare l'attività germinativa, e dotati di sistema *mist* per il mantenimento di un idoneo grado di umidità atmosferica. I tunnel predisposti sopra i bancali venivano poi coperti con uno strato di tessuto-non tessuto, con un telo plastico di polietilene, e l'irrigazione sulle seminiere è stata del tipo a microportata.

Le prime emergenze si sono avute in media dopo 7 - 10 giorni. Nella primavera del secondo anno di vita le piante venivano collocate in vasi di dimensioni maggiori (volume 3 l), utilizzando un substrato appositamente predisposto (25 % sabbia, 15 % torba, 10% perlite e 50 % terreno di medio impasto), con somministrazioni irrigue di frequenza e volume variabili, in funzione del decorso stagionale.

3.2.2 Prove di propagazione agamica

Nell'iperico le percentuali di germinabilità del seme sono basse e molto variabili, caratteristica che porta all'aleatorietà dei risultati nel caso dell'impianto per seme. La riproduzione sessuata ha inoltre la peculiarità di riproporre nelle piante in coltivazione una "miscela" genetica simile alla popolazione di partenza, importante da un punto di vista ecologico e di mantenimento della diversità, ma che non permette la valorizzazione di individui che si distinguono per interessanti peculiarità (maggiore resistenza a stress, a malattie, con superiori contenuti in principi attivi) importanti per il tipo di coltivazione che ci si appresta a realizzare. Il genere *Hypericum* comprende specie che mostrano una naturale predisposizione alla radicazione, ma anche in questo caso in letteratura vi è scarsa disponibilità di lavori che affrontino la specifica tematica della propagazione per parti di pianta, se non intesa come micropropagazione. Per tutti questi motivi, è stato ritenuto interessante l'approfondimento di alcuni aspetti della propagazione agamica, da proporre come possibile alternativa alla moltiplicazione per seme, sia nel caso di coltivazione in pieno campo che in tutti i casi in cui l'uso di piante di provenienza clonale sia preferibile.

- Taleaggio

Tra le condizioni che determinano la buona riuscita della radicazione, un ruolo preminente spetta senza dubbio alla selezione del miglior substrato di radicamento. La prova di moltiplicazione agamica ha visto il prelievo, in due diverse epoche (aprile e novembre 2013) di talee semilegnose (2-3 nodi, 8-10 cm) da piante di *H. perforatum* in buone condizioni fitosanitarie, al loro secondo anno di vita. Nella prima epoca è stata prevista, inoltre, una ulteriore verifica per valutare se la presenza o meno di foglie nelle talee potesse comportare un diverso comportamento nella radicazione.



Talee di *H. perforatum* su sabbia

Le talee sono quindi state poste a radicare su

tre diversi substrati: sabbia (100 %), miscela di sabbia/torba/perlite (1:1:1, v/v/v) e di sabbia/torba (1:1, v/v) all'interno di contenitori alveolari; è stata utilizzata torba del tipo torba acida (TECNIC – Free Peat B.V., Sluiskade, Vriezenveen, Netherlands) e perlite del tipo medio-fine con diametro di 2-5 mm (AGRIPAN 100, Perlite Italiana s.r.l., Corsico (MI), Italia). Sul 50% del materiale vegetale è stato utilizzato un ormone radicante (ac. naftalenacetico, NAA, in polvere, al 4%: GERMON, Gerlach GmbH, Lubbecke, Germany). I contenitori sono stati poi collocati all'interno di una serra, su bancali provvisti di riscaldamento basale e di sistema di nebulizzazione del tipo *mist* (umidità relativa 75%), in condizioni di fotoperiodo naturale.

È stato adottato uno schema sperimentale di tipo fattoriale (2 epoche di taleaggio x 3 substrati di radicazione x 2 concentrazioni ormonali) con tre ripetizioni.

Lo stato vegetativo e fitosanitario delle talee è stato monitorato periodicamente. Dopo 40 giorni dall'inizio della prova per ogni trattamento sono stati rilevati il tasso di sopravvivenza, la percentuale di radicazione, il numero e la lunghezza delle radici per talea.

- Micropropagazione

L'uso di sistemi di coltura *in vitro* è stato frequentemente indicato come una possibile strategia alternativa per la produzione di materiale vegetale per l'industria farmaceutica, in grado di soddisfare la crescente domanda di prodotti naturali e di ottenere preparati di

composizione meno variabile. Tuttavia, in generale l'uso di colture di tessuti vegetali su larga scala ha avuto un successo limitato, perché i rendimenti dei composti secondari nelle colture sono spesso troppo bassi per la commercializzazione (Karppinen 2010). In questi casi il processo è comunque stato verificato solo fino alla fase di moltiplicazione e poche sono le informazioni disponibili sulle successive fasi di radicazione e acclimatemento, indispensabili qualora si desideri ottenere piantine sane e vitali da immettere in un ciclo produttivo.



Coltura *in vitro* di *H. perforatum* su substrato di crescita MS

È stata pertanto avviata una prova per la definizione di un efficace e completo protocollo di radicazione *in vitro* ed acclimatemento *ex-vitro* di una accessione di *H. perforatum* siciliano, tale da fornire utili indicazioni alle attività vivaistiche finalizzate alla produzione di massa di genotipi selezionati in base alla

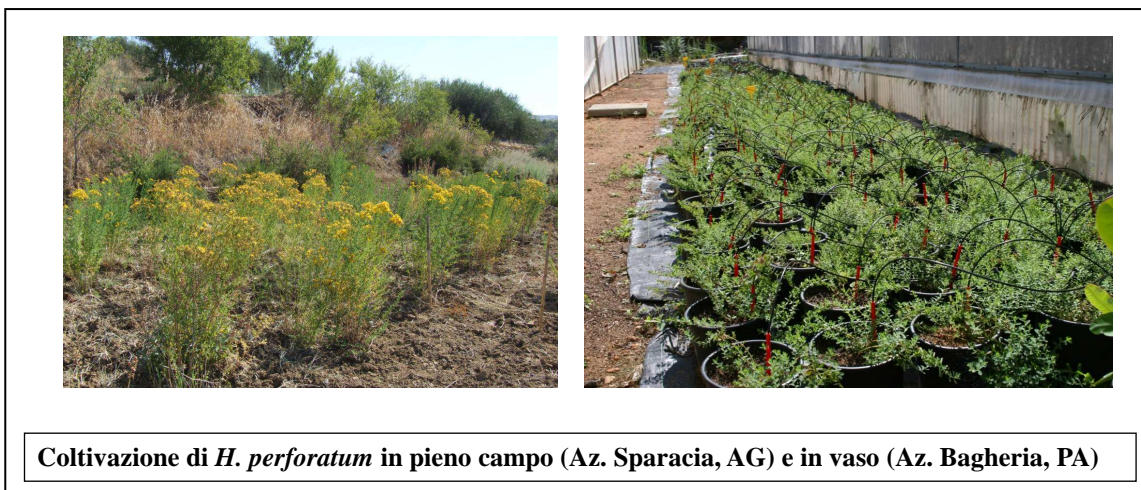
presenza di caratteristiche favorevoli (resistenza agli stress, basse esigenze agronomiche, crescita rapida, etc.).

Come fonte di espianto per l'introduzione *in vitro* sono stati utilizzati i segmenti nodali di piantine di otto settimane posti su substrato di crescita di Murashige e Skoog (MS). Gli espianti asettici sono stati poi trasferiti su substrato di moltiplicazione MS integrato con 4,44 μM di 6-benziladenina (BA). Una volta ottenuto un congruo numero di germogli, questi sono stati trasferiti su substrati specifici per la radicazione *in vitro*, per valutare l'effetto sull'emissione della radici del contenuto in macro e microelementi del substrato e di diverse auxine. Sono stati confrontati substrati MS (base e $\frac{1}{2}$ forza) con o senza l'aggiunta di 5.71 μM di acido indol-3-acetico (IAA) o 4.9 μM di acido indol-3-butyrico (IBA). Dopo 40 giorni sono stati registrati la percentuale di radicazione dei germogli, il numero di radici per germoglio, la lunghezza delle radici e il peso delle plantule radicate.

3.2.3 Prove di adattabilità alle condizioni di pieno campo ed in vaso

Ad oggi la specie *H. perforatum* è stata studiata in maniera approfondita sotto numerosi aspetti sia agronomici (adattabilità, tecnica di coltivazione, rese) (Büter *et al* 1998, Bruni *et al* 2009) che chimico-farmacologici (rese in principi attivi e loro efficacia, modalità di dosaggio e somministrazione, effetti clinici) (Saxena *et al* 2007). In linea

generale, la specie ha mostrato notevoli doti di rusticità e una buona adattabilità alla coltivazione in aree semiaride, anche in conduzione poliennale e in assenza di input energetici di rilievo, manifestando ottime potenzialità di inserimento nei sistemi colturali mediterranei, dove potrebbe contribuire al potenziamento delle caratteristiche di multifunzionalità aziendali, incrementando il reddito degli agricoltori (Carrubba *et al.* 2010).



Coltivazione di *H. perforatum* in pieno campo (Az. Sparacia, AG) e in vaso (Az. Bagheria, PA)

Con lo scopo di ottenere nuove informazioni sulla risposta fisiologica, produttiva e qualitativa della specie in condizioni colturali diverse, sono state realizzate due prove di coltivazione, condotte in pieno campo ed in vaso, di accessioni di *H. perforatum* provenienti da tre diverse aree geografiche italiane, rispettivamente dalla provincia di Trento (monte Bondone - TN), dall'area del comune di Massa Marittima (province di Siena e Grosseto) e dall'area del comune di S. Biagio Platani (provincia di Agrigento), considerate rappresentative dell'area settentrionale, centrale e meridionale del territorio nazionale. La prova effettuata in contenitori, in condizioni più controllate e sottoposta ad irrigazione nei momenti di maggiore stress idrico, ha avuto come obiettivo principale lo studio di alcuni aspetti qualitativi della produzione (differenze nella quantità di principi attivi prodotti).

La prova effettuata in piena terra è stata invece finalizzata all'acquisizione di indicazioni riguardo alla capacità di adattamento delle diverse provenienze a condizioni di coltivazione a input ridotto. Il confronto tra le due condizioni colturali è stato infine orientato prevalentemente allo studio delle variazioni fenologiche (epoca di fioritura) e qualitative (quantità di principi attivi) della specie, in funzione anche della provenienza geografica dei genotipi.

La prova di pieno campo è stata svolta presso l'azienda sperimentale "Sparacia" dell'Università degli studi di Palermo, nel comune di Cammarata (AG), mentre le piante

coltivate in vaso sono state ospitate presso la struttura del CRA-SFM, localizzata nel comune di Bagheria (PA).

Le piante utilizzate provenivano tutte dalla semina effettuata nel giugno del 2012 presso l'azienda del CRA di Bagheria.

Il dispositivo impiantato presso l'azienda “Sparacia” è stato impostato ponendo in piena terra, nel novembre 2012, 90 piante di *H. perforatum* provenienti dal comune di Cammarata (PFR-AG), 50 piante originarie della provincia di Trento (PFR-TN) e 50 piante della provincia di Siena (PFR-SI), disposte a sesti di 50 cm tra le file e 40 cm sulla fila. Non è stato effettuato alcun intervento di fertilizzazione e gli interventi irrigui di soccorso sono stati effettuati solamente nel periodo estivo.

Il dispositivo sperimentale impostato presso le strutture del CRA di Bagheria ha compreso: 80 piante di *H. perforatum* provenienti dal comune di Cammarata (PFR-AG), 50 piante originarie della provincia di Trento (PFR-TN) e 50 piante della provincia di Siena (PFR-SI). Nel luglio 2012, tali piante sono state sistemate in vasi da 18 cm di diametro, con substrato costituito da una miscela di torba, sabbia e vermiculite, rispettivamente in ragione del 60, 30 e 10 % in peso, quindi sistemate all'aperto, senza fertilizzazione di base e fornite di irrigazione tipo a microportata .

Entrambi i dispositivi sono stati monitorati periodicamente per valutare l'accrescimento delle piante e le condizioni fitosanitarie complessive. Al momento della fioritura del secondo e del terzo anno di coltivazione (giugno 2013 e giugno 2014) si è proceduto al prelievo di 5 piante per tesi, su cui sono stati effettuati i rilievi distruttivi. Sono stati misurati i seguenti parametri: altezza della pianta, numero di fusti con e senza fiori, peso fresco della pianta intera, peso fresco delle sommità fiorite, peso erboristico (dopo essiccazione all'aria e all'ombra), peso secco (previa essiccazione in stufa a 105 °C per 24 hh).

3.2.4 Prove di micorrizzazione

Come è noto, numerose piante in natura sono soggette a peculiari forme di simbiosi con alcuni funghi terricoli del phylum delle *Glomales*, comunemente chiamati funghi arbuscolo-micorrizici (AM) (Smith e Read 2008). In questa simbiosi, il fungo AM



Prova di micorrizzazione, 1° anno (a sx senza micorrize e a dx con micorrize)

assorbe elementi nutritivi (in particolare fosforo) e li trasloca nella pianta in cambio di fotosintetati. Nelle condizioni mediterranee, l'inoculo delle piante con funghi arbuscolomicorrizici è stato ritenuto spesso responsabile di un miglioramento complessivo delle performance produttive delle colture ospiti (Saia *et al* 2012). In questa sede si è voluto valutare l'effetto della simbiosi con funghi AM, in presenza ed in assenza di integrazione fosfatica, sulla risposta vegetativa e produttiva della coltura e sulla qualità degli estratti.

La prova è stata avviata nella primavera del 2012, utilizzando un sistema sperimentale fattoriale con 4 repliche, impiegando piantine provenienti dalla collezione di *H. perforatum* precedentemente costituita e disponibile presso le strutture del CRA di Bagheria (PFR-AG).

Le piante sono state allevate in vasi di 18 cm di diametro (volume 4 l) su substrato composto da una miscela di torba, sabbia e vermiculite (2:1:0,5 v/v/v).

All'impianto della prova, metà delle piante è stata collocata su substrato inoculato ottenuto ponendo 1 g per vaso di una miscela di spore di 8 diverse specie di funghi AM (*Glomus clarum*; *G. intraradices*; *G. mosseae*; *G. deserticola*; *G. monosporus*; *G. brasilianum*; *G. aggregatum*; *Gigaspora margarita*). A partire da questo momento le piante sono state mantenute per 8 mesi all'aperto con l'ausilio della sola irrigazione di soccorso durante il periodo estivo.

Nel marzo del 2013 è stato effettuato un rilievo distruttivo su 4 piante per ciascuno dei due trattamenti per valutarne il peso, fresco e secco, della parte aerea e delle radici.

Le piante sono state quindi travasate in vasi di 22 cm di diametro contenenti lo stesso substrato utilizzato all'impianto. Ogni trattamento è stato ulteriormente suddiviso in due

lotti, concimandone uno con perfosfato semplice in ragione di 20 ppm di P_2O_5 (corrispondenti a 8,7 ppm di fosforo elementare) per kg di substrato utilizzato. I vasi sono stati quindi trasferiti in serra fredda dove sono stati forniti di irrigazione (200 ml di acqua 2 volte alla settimana).

Successivamente, man mano che le piante raggiungevano la fase di fioritura (da maggio a luglio), sono stati rilevati il numero di steli fioriti, il numero di fiori e l'altezza media per pianta. Si è poi proceduto alla raccolta di campioni rappresentativi delle sommità fiorite da destinare alle successive valutazioni biometriche ed analitiche.



**Prova di micorizzazione,
2° anno in serra fredda**

All'inizio del mese di luglio è stato valutato lo SPAD (Soil Plant Analysis Development, indice del contenuto relativo di clorofilla), misurando *in vivo* il tenore di clorofilla su 5 foglioline individuate a caso sulla porzione mediana di 5 steli fioriti diversi per ogni pianta. In seguito sono stati effettuati i rilievi distruttivi valutando il peso fresco e secco delle parti aeree e delle radici.

3.2.5 Studi dell'influenza del fotoperiodo sulla fioritura

Le piante sono fortemente condizionate dalla qualità della luce, ovvero dalla sua lunghezza d'onda e dalla durata delle ore di illuminazione giornaliera. Lo stesso ciclo vitale, lo sviluppo ed il raggiungimento della maturità sessuale con la formazione del fiore sono da queste condizionate. È noto che vi sono piante brevidiurne e piante longidiurne o anche neutrodiurne. È il fotoperiodo, quindi, che determina l'attivazione di metaboliti secondari divenendo responsabile della maggiore o minore produzione di principi attivi. L'organo sensibile alle variazioni luminose è la foglia, da cui, una volta stimolata, iniziano i processi biochimici che si trasmettono all'apice vegetativo, dove finalmente si avvia la morfogenesi degli organi riproduttivi.

L'iperico è una pianta longidiurna (LDP), con una lunghezza critica del giorno di 15 hh, necessarie per l'induzione alla fioritura e quindi per lo sviluppo del seme. Sia l'estensione della lunghezza del giorno (più di 15 hh) che l'interruzione notturna con luce artificiale sono efficaci per l'induzione a fiore e la formazione di seme (Chen *et al* 2010).

Poiché nella maggior parte delle specie di iperico l'esordio della fase di fioritura avviene nel secondo anno di coltivazione delle piante, è stata impostata una prova preliminare allo scopo di verificare in che misura la manipolazione del fotoperiodo potesse influire sull'avvio della fioritura e determinare eventuali differenze nella produzione di composti

bioattivi (ipericina, pseudoipericina e iperforina).

La prova è iniziata nella prima decade di novembre 2012 e si è protratta per 90 giorni. Sono stati posti a confronto due trattamenti, il primo in condizioni di temperatura e luce naturali, ed il secondo collocando le piante in armadio termostato, in condizioni di illuminazione ininterrotta (circa 5000 lux per 24 hh) ad una temperatura di $22 \pm 0,2$ °C, con circa il 50% di umidità. Per la prova sono state impiegate 48 piante di *H. perforatum*, provenienti dalla prima semina del



***H. perforatum* allevato in
armadio termostato in
fioritura**

2012, collocate in vasetti di 10 x 10 cm, con substrato misto di torba e sabbia (1:1).

Il rifornimento idrico veniva assicurato mediante la somministrazione di circa 100 cc di acqua per pianta ogni 2-3 giorni. In tutti i dispositivi venivano poi monitorati lo stato fitosanitario delle piante, e sono stati rilevati l'avvio e la durata della fioritura.

I rilievi successivi sono stati effettuati ogni 10 giorni a partire dalle rispettive date di esordio della fioritura; per ciascuno dei due trattamenti, nella fase di massima fioritura sono stati prelevati campioni rappresentativi di soli fiori (non cime fiorite) su cui è stata eseguita l'analisi chimica; alcune capsule sono state lasciate in pianta per valutare la maturazione dei semi.

3.2.6 Studi preliminari di resistenza/tolleranza allo stress salino

Nelle regioni aride e semi-aride, lo stress salino e quello idrico sono tra i principali ostacoli alla coltivazione di numerose specie, di cui possono seriamente limitare la crescita e la produttività (Allakhverdiev *et al* 2000). Malgrado la loro importanza, considerando che l'estensione delle aree aride e semiaride nel mondo aumenta di anno in anno (Rhoades e Loveday 1990, Tanji 1990), gli studi effettuati su questo argomento sono ancora piuttosto limitati.

Con l'obiettivo di definire alcuni aspetti sulle condizioni di tolleranza/resistenza dell'iperico alla salinità, è stata valutata l'ipotesi che condizioni di assenza/presenza di salinità, imposte in due diverse fasi fenologiche della pianta (germinazione e fioritura), potessero determinare una riduzione della produzione o apprezzabili effetti sulla sua qualità (Pessarakly 1994).

La prova, avviata nell'aprile 2013, è terminata nel giugno dello stesso anno, per una durata complessiva di 60 giorni, ed ha riguardato un totale di 82 piante di *H. perforatum* di due anni (10 utilizzate per i trattamenti distruttivi all'inizio della prova e 72 destinate ai trattamenti previsti dal protocollo sperimentale). Le piante erano poste in vasi da 3 l (diametro 16 cm), riempiti con un substrato costituito da una miscela al 20 % di torba, 50 % di sabbia e 30 % di agriperlite. 36 piante sono state inoculate ponendo nel substrato 1 g per vaso di una miscela di spore di 8 diverse specie di funghi AM (*Glomus clarum*; *G. intraradices*; *G. mosseae*; *G. deserticola*; *G. monosporus*; *G. brasilianum*; *G. aggregatum*; *Gigaspora margarita*), ottenendo così due set sperimentali, di seguito indicati con M (piante micorrizzate) e N (piante non micorrizzate). 12 piante prelevate da ciascuno dei due gruppi sono state irrigate con acqua salinizzata mediante aggiunta di NaCl in ragione di 50 (A) e 100 (B) mM/L, e poste a confronto con un testimone non trattato (tesi C), anch'esso

costituito da 12 piante. Per l'intera durata della prova è stato eseguito il monitoraggio delle condizioni fitosanitarie, di sviluppo e accrescimento delle piante.



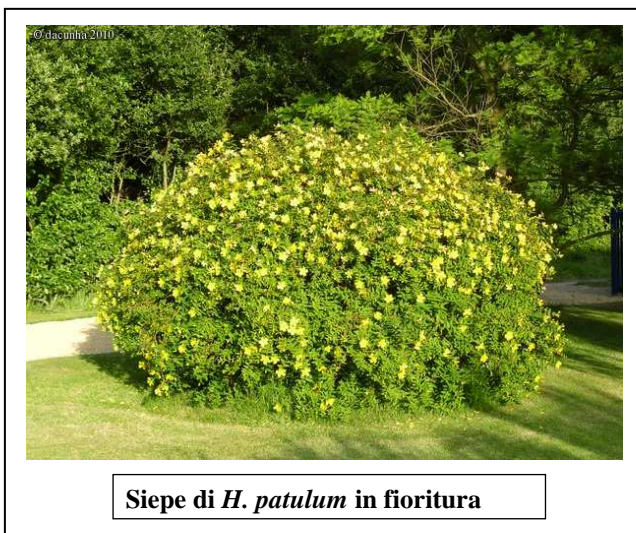
Prova di stress salino su *H. perforatum*, tesi a confronto

Gli interventi irrigui, differenziati in base alla salinità dell'acqua, sono stati effettuati ogni due giorni, utilizzando per ogni vaso un quantitativo d'acqua tale da riportare il substrato alla capacità di campo. La stima del volume distribuito è stata effettuata su base gravimetrica, pesando il singolo vaso prima e dopo ogni irrigazione ed ipotizzando una quota di lisciviazione del

30%. Al termine della prova sono stati effettuati i rilievi distruttivi sulle piante, misurandone il numero di fiori per ciascuna e il peso fresco e secco delle diverse frazioni botaniche (foglie e fusti; radici). L'effetto esercitato sulle piante dallo stress salino imposto con i diversi trattamenti è stato valutato misurando in vivo il loro contenuto in clorofilla, mediante rilevazione, sia all'inizio che alla fine della prova, dei valori di SPAD (Soil Plant Analysis Development) in 5 foglioline individuate sulla porzione mediana di 5 steli fioriti diversi per ogni pianta.

3.2.7 Potenzialità di utilizzo in ambito florovivaistico

L'impiego a fini ornamentali di alcune specie del genere *Hypericum* dotate di particolare valenza estetica riveste un significato non marginale all'interno del comparto florovivaistico, ma indubbiamente suscettibile di ulteriore miglioramento. Già da anni nel nostro Paese alcune varietà commerciali selezionate di *H. androsaemum*, *H. calycinum* e *H. patulum* vengono impiegate come piante ornamentali da vaso o da esterno, ma un certo interesse sembra poter essere espresso da *H. pubescens*, che con il suo portamento strisciante, il ricco fogliame verde salvia e un'apparente predisposizione a emettere radici alle intersezioni fogliari può rivelarsi adatta come specie ornamentale coprisuolo. In particolare in bibliografia viene riportata come specie tollerante per media salinità, in terreni umidi, dunque adatta ad ambienti marginali. Ci si è pertanto proposti l'obiettivo di seguire alcune di queste specie nel loro adattamento alle condizioni climatiche tipiche dell'area mediterranea, per studiarne ulteriormente le potenzialità commerciali.



Oltre a queste specie, sono stati selezionati alcuni individui di *H. perforatum*, ottenuti nel 2012 da seme, che per talune loro peculiarità (taglia, habitus, compattezza e durata della fioritura) si sono rivelati particolarmente interessanti per l'uso ornamentale.

Nel luglio del 2014 le 4 specie selezionate (*H. androseum*, *H.*

calycinum, *H. patulum* e *H. pubescens*) sono state collocate in piena terra, adottando un sesto d'impianto a settonce (distanza 50-70 cm, secondo la rigogliosità della specie) e con una fertilizzazione di base con concime a lento rilascio (NPK ORIGINAL GOLD, indicato per i giovani impianti, della COMPO EXPERT Italia, in ragione di 50 g m⁻²). Su queste accessioni è stato valutato il livello di adattamento complessivo, monitorandone l'accrescimento degli steli, l'epoca, la durata e la persistenza della fioritura, nonché il comportamento nei periodi di stasi vegetativa (lunghezza della stasi e rapidità del ricaccio).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 - CARATTERIZZAZIONE DELLE SPECIE INDAGATE

4.1.1 - Raccolta e conservazione del materiale vegetale e dei semi

Nel corso dei tre anni sono state reperite complessivamente 67 accessioni del genere *Hypericum*, appartenenti a 12 diverse specie. A parte quelle provenienti dagli Orti botanici (15), tutte le altre sono state individuate grazie alle ricognizioni svolte nelle varie località percorse durante le escursioni effettuate. I campioni vegetali da sottoporre ad analisi chimica sono stati 45, di cui 26 siciliani e 19 provenienti dal resto di Italia, i biotipi da cui è stato possibile reperire il seme sono stati 32 (13 siciliani, 19 da altre parti d'Italia). Da seme, ma anche da parti di pianta, sono stati messi in coltivazione 38 biotipi (16 siciliani, 22 da altre parti d'Italia). La tabella 4.1.1.1 riassume l'insieme delle attività effettuate.

Tab 4.1.1.1 Elenco dei biotipi di *Hypericum* reperiti e attività svolta su di essi nel corso del triennio

	Accessione	Provenienza	codice	localizzato	seme	coltivazione	Analisi chim.
1	<i>H. perforatum</i>	Cammarata (AG)	PFR 1	X	X	X	X
2	<i>H. perforatum</i>	Capo Gallo (PA)	PFR 2	X	X	X	X
3	<i>H. perforatum</i>	PianoFerro (PA)	PFR 3	X	X	X	X
4	<i>H. perforatum</i>	PianoMàrcato (PA)	PFR 4	X	X	X	X
5	<i>H. perforatum</i>	M. Catalfano (PA)	PFR 5	X	-	-	-
6	<i>H. perforatum</i>	M. Petroso (PA)	PFR 7	X	X	X	X
7	<i>H. perforatum</i>	Pomieri (PA)	PFR 8	X	-	-	X
8	<i>H. perforatum</i>	Monforte S.Giorgio(ME)	PFR 9	X	-	-	-
9	<i>H. perforatum</i>	Macee (AR)	PFR 10	X	X	X	X
10	<i>H. perforatum</i>	Loscove (AR)	PFR 11	X	X	X	X
11	<i>H. perforatum</i>	Camaldoli (AR)	PFR 12	X	X	X	X
12	<i>H. perforatum</i>	Marino (RM)	PFR 13	X	-	-	X
13	<i>H. perforatum</i>	Vicaretto (PA)	PFR 14	X	X	X	X
14	<i>H. perforatum</i>	Contessa Entellina (PA)	PFR 15	X	-	-	X
15	<i>H. perforatum</i>	Ucria (ME)	PFR 16	X	-	-	X
16	<i>H. perforatum</i>	Pian dell'occhioI (PA)	PFR 17a	X	-	-	X
17	<i>H. perforatum</i>	Pian dell'occhio II (PA)	PFR 17b	X	-	-	X
18	<i>H. perforatum</i>	Blufi (PA)	PFR 18	X	-	-	X
19	<i>H. perforatum</i>	Polizzi Generosa (PA)	PFR 19	X	-	-	X
20	<i>H. perforatum</i>	Buiano (AR)	PFR 20	X	-	-	X
21	<i>H. perforatum</i>	Consuma (FI)	PFR 21	X	-	-	X

Tab 4.1.1.1 (cont.) Elenco dei biotipi di *Hypericum* reperiti e attività svolta su di essi nel corso del triennio

	Accessione	Provenienza	codice	localizzato	seme	coltivazione	Analisi chim.
22	<i>H. perforatum</i>	Borselli (FI)	PFR 22	X	-	-	X
23	<i>H. perforatum</i>	Pratomagno (AR)	PFR 23	X	-	-	X
24	<i>H. perforatum</i>	Orto botanico Siena	PFR-SI	-	X	X	X
25	<i>H. perforatum</i>	Orto botanico Trento	PFR-TN	-	X	X	X
26	<i>H. perforatum</i>	Orto botanico Isernia	PFR-IS	-	X	X	X
27	<i>H. perforatum</i>	Orto botanico Ancona	PFR-AN	-	X	X	X
28	<i>H. perforatum</i>	Orto botanico Napoli	PFR-NA	-	X	X	X
29	<i>H. perforatum</i>	Orto botanico Roma	PFR-RM	-	X	X	X
30	<i>H. perforatum</i>	Capo Gallo (PA)	PFL 1	X	X	X	-
31	<i>H. perforatum</i>	Monte Catalfano (PA)	PFL 2	X	X	X	X
32	<i>H. perforatum</i>	Piano Mârcato (PA)	PFL 3	X	X	X	-
33	<i>H. perforatum</i>	Pianoferro (PA)	PFL 4	X	-	-	X
34	<i>H. perforatum</i>	Monte Petroso (PA)	PFL 5	X	X	X	-
35	<i>H. perforatum</i>	Cammarata (AG)	PFL 6	X	-	-	X
36	<i>H. perforatum</i>	Pomieri (PA)	PFL 7	X	-	-	-
37	<i>H. perforatum</i>	Sinagra (ME)	PFL 8	X	-	-	-
38	<i>H. perforatum</i>	Contessa Entellina (PA)	PFL 9	X	-	-	X
39	<i>H. perforatum</i>	Ucria (ME)	PFL 10	X	-	-	X
40	<i>H. perforatum</i>	Polizzi Generosa (PA)	PFL 11	X	-	-	X
41	<i>H. perforatum</i>	Pian dell'occhio (PA)	PFL 12	X	-	-	X
42	<i>H. perforatum</i>	Vicaretto (PA)	PFL 14	X	X	-	-
43	<i>H. aegypticum</i>	Lampedusa (AG)	EGP 1	X	-	X	-
44	<i>H. androseumum</i>	Orto botanico Parma	AND-PR	-	X	X	-
45	<i>H. androseumum</i>	Orto botanico Siena	AND-SI	-	X	X	-
46	<i>H. androseumum</i>	Orto botanico Ancona	AND-AN	-	X	X	-
47	<i>H. androseumum</i>	Orto botanico Roma	AND-RM	-	X	X	-
48	<i>H. androseumum</i>	Camaldoli (AR)	AND 1	-	X	X	-
49	<i>H. montanum</i>	Orto botanico Ancona	MNT-AN	-	X	X	X
50	<i>H. montanum</i>	Camaldoli (AR)	MNT 1	-	X	X	X
51	<i>H. hirsutum</i>	Orto botanico Siena	HRS 1	-	X	X	X
52	<i>H. hircinum</i>	Monforte S.G. (ME)	HRC1	X	-	-	-
53	<i>H. hircinum</i>	Sinagra (ME)	HRC2	X	-	X	X

Tab 4.1.1.1 (cont.) Elenco dei biotipi di *Hypericum* reperiti e attività svolta su di essi nel corso del triennio

	Accessione	Provenienza	codice	localizzato	seme	coltivazione	Analisi chim.
54	<i>H. pubescens</i>	Campobello (TP)	PUB 1	X	-	-	-
55	<i>H. pubescens</i>	Mazara (TP)	PUB 2	X	-	-	-
56	<i>H. pubescens</i>	Città di Palermo	PUB 3	X	X	X	X
57	<i>H. pubescens</i>	Orto botanico Palermo	PUB 4	X	X	X	X
58	<i>H. richeri</i>	Orto botanico Parma	RCH 1	-	X	X	-
59	<i>H. tetrapterum</i>	Orto botanico Roma	TRP-RM	-	X	X	X
60	<i>H. tetrapterum</i>	prima Floresta	TRP 1	X	-	-	X
61	<i>H. tetrapterum</i>	dopo Floresta	TRP 2	X	-	-	X
62	<i>H. tetrapterum</i>	Stia (AR)	TRP 3	X	-	-	X
63	<i>H. calycinum</i>	Palermo	CLC 1		-	X	-
64	<i>H. calycinum</i>	Bibbiena (AR)	CLC 2	X	-	X	-
65	<i>H. calycinum</i>	Ucria (ME)	CLC 3	X	-	X	X
66	<i>H. patulum</i>	Bibbiena (AR)	PTL 1	X	-	X	-
67	<i>H. patulum</i>	Stia (AR)	PTL 2	X	-	-	-

**Luoghi dei biotipi di *Hypericum* reperiti in Sicilia**

Per alcuni di questi biotipi e specie è stato misurato il peso dei 1000 semi, riportato in tabella 4.1.1.2. In genere i semi dell'*Hypericum* sono piccolissimi acheni, a forma di botticella, lunghi da 0,4 a 1,5 mm, con un peso medio (per 1000 semi) che va da un minimo di 0,040 g di *H. tetrapterum* a 0,509 g di *H. calycinum*. Le foto nelle figure da 4.1.1.1 a 4.1.1.6 mostrano, fortemente ingranditi con un microscopio stereo multizoom marca Nikon mod. AZ100, i semi di alcune tra le specie reperite. I semi sono stati posti su carta millimetrata (rif.: 1 mm), per evidenziarne le dimensioni, le diversità morfologiche e di colore.

Tab 4.1.1.2 pesi medi (mg) di 1000 semi di biotipi di <i>Hypericum</i>	
Accessione	Peso medio di 1000 semi in mg
H. perforatum, loc. Cammarata (AG)	125,6
H. perforatum Orto botanico Roma	147,6
H. perforatum Orto botanico Isernia	128,8
H. perforatum Orto botanico Ancona	105,4
H. perforatum Orto botanico Napoli	96,0
H. perforatum Orto botanico Trento	141,9
H. perforatum Orto botanico Siena	147,6
H. perforatum Capo Gallo (PA)	115,0
H. perforatum Piano Màrcato (PA)	108,9
H. perforatum Pianoferro (PA)	129,5
H. perforatum Loscove (AR)	99,2
H. perforatum Macee (AR)	100,4
H. perforatum Camaldoli (AR)	86,4
H. perfoliatum Piano Màrcato (PA)	132,6
H. perfoliatum M. Catalfano (PA)	113,8
H. perfoliatum Capo Gallo (PA)	142,4
H. androsaemum Orto botanico PARMA	73,8
H. androsaemum Orto botanico SIENA	131,6
H. androsaemum Orto botanico ANCONA	76,8
H. androsaemum Camaldoli (AR)	98,4
H. richeri Orto botanico Parma	146,0
H. calycinum Palermo	463,1
H. calycinum Orto botanico Roma	509,5
H. montanum Orto botanico Ancona	77,0
H. montanum Camaldoli (AR)	43,8
H. tetrapterum Orto botanico ROMA	40,0
H. hirsutum Orto botanico SIENA	115,6
H. pubescens Mazara del vallo (TP)	47,9

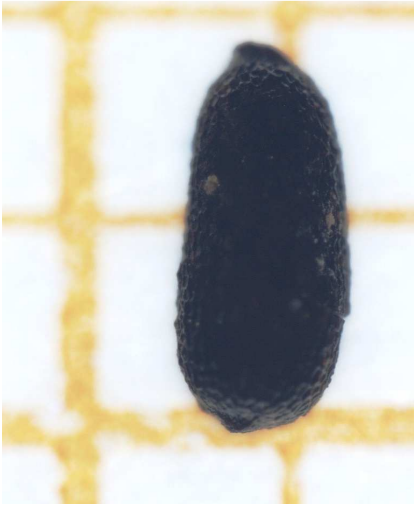


Fig. 4.1.1.1 - seme di *H. androsaemum*



Fig. 4.1.1.2 - seme di *H. calycinum*



Fig. 4.1.1.3 - seme di *H. hirsutum*

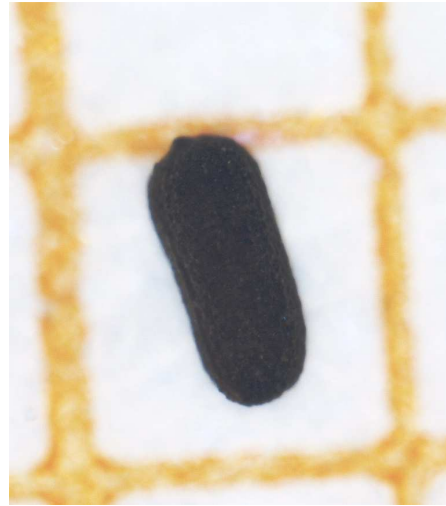


Fig. 4.1.1.4 - seme di *H. montanum*



Fig. 4.1.1.5 - seme di *H. tetrapterum*



Fig. 4.1.1.6 - seme di *H. perforatum*

4.1.2 Descrizione botanica e habitat

La descrizione, specie per specie, presentata di seguito sarà in ordine alfabetico e riguarderà le sole specie reperite e/o coltivate in azienda.



Fig. 4.1.2.1 - *Hypericum aegypticum* in fiore

***H. aegypticum* L.** (Erba di S. Giovanni egiziana; fig. 4.1.2.1)

È un piccolo arbusto a portamento compatto, perenne, di modeste dimensioni che può raggiungere un'altezza massima di 15-20 cm. Ha foglie lunghe fino a 1 cm, da ellittiche a strettamente oblunghie, coriacee e di colore grigio-verde. Non ci sono ghiandole nere, ma piuttosto ghiandole

traslucide su tutta la superficie fogliare (Perrone *et al* 2013 a). I fiori sono piccoli (1 cm di diametro) e solitari agli apici. Si trova solitamente su scogliere e rocce vicino al mare (altitudine 0/200 m s.l.m.), non è resistente al gelo. La fioritura avviene da gennaio a giugno (actaplantarum.org). Localizzato nelle coste atlantiche meridionali e mediterranee centro-orientali (dalla Sardegna a Creta) (Perrone *et al* 2013 b), in Sicilia è segnalato nell'isola di Lampedusa (AG) in diversi punti della costa. Poche pubblicazioni si trovano a suo riguardo. Crockett *et al* (2007) hanno valutato la presenza di oli essenziali nel suo estratto e Attard e Pacioni (2011) ne riportano l'utilizzazione come succo per la guarigione delle ferite, in caso di infezioni del tratto urinario e per aumentare il flusso mestruale.

Attualmente se ne hanno in coltivazione alcuni individui ottenuti per talea.



Fig. 4.1.2.2 - *H. androsaemum* con bacche verdi immature

***H. androsaemum* L.** (Erba di S. Giovanni arbustiva; Fig. 4.1.2.2).

È una pianta perenne suffrutescente, con fusti legnosi alla base, ascendenti e rami rossastri, alta da 30 a 120 cm. I giovani steli sono caratterizzati da 2 linee spigolose longitudinali. Le foglie di un bel colore verde

glaucò, sono ovate o ovato-lanceolate, grandi (2-5 x 5-10 cm), generalmente

amplessicauli. Non presenta ghiandole nere su foglie e fusti e sulla lamina le caratteristiche depressioni (Perrone *et al* 2013a) indicano la presenza di ghiandole traslucide nel mesofillo. L'infiorescenza, visibile da maggio a luglio, è un corimbo, i cui fiori gialli hanno petali (6 x 12 mm) che sorpassano di poco i sepali (ovati e ineguali di 3-5 x 5-8 mm). Gli stami numerosi e raccolti in 5 gruppi sono più lunghi dei petali, e presentano 3 stili ricurvi verso l'esterno. Il frutto è costituito da capsule carnose (\varnothing 8 mm), dapprima verdi poi rossastre infine nere alla maturità, contenenti i semi e circondate da sepali persistenti. È presente in Europa occidentale, localmente in Europa meridionale e si trova in tutta Italia, fino ad un'altitudine di 1400 m s.l.m. (Perrone *et al* 2013b), ad esclusione della Valle d'Aosta (actaplantarum.org), nei boschi e sui pendii ombrosi e freschi. Per le sue caratteristiche estetiche (foglie e frutti) viene impiegato a scopo ornamentale nei giardini per bordure e siepi. Viene usata anche come fronda recisa, per le sue bacche, in bouquet da sposa. Se ne conosce anche un impiego terapeutico come infuso nelle coliche e nella cattiva digestione, nei problemi renali ed emicranie (Guedes *et al* 2009), e quale diuretico, epatoprotettivo ed antiossidante (Almeida *et al*



Fig. 4.1.2.3 - Habitat naturale di *H. androsaemum* (Camaldoli, AR)

2009). Ertürk *et al* (2004) lo citano come insetticida nematotossico. Nürk e Crockett (2011) riportano che in varie parti della pianta sono stati isolati derivati dell'acido caffeico, flavonoidi, triterpeni, antroni semplici e xantoni. Molta ricerca è stata sviluppata su colture cellulari di questa specie e si è rivelato un buon modello con cui studiare la biosintesi di xanthone e benzofenone. Gli studi dei componenti volatili hanno rivelato alti livelli di



Fig. 4.1.2.4 - fiore di *H. calycinum*

idrocarburi a catena lunga, ossido caryophyllene e ishwarane. Sono in coltivazione 4 accessioni di cui 3 in prova per fini ornamentali.

***H. calycinum* L.** (Erba di San Giovanni a calice persistente; fig. 4.1.2.4)

Si presenta come un piccolo arbusto sempreverde, di medie dimensioni, alto 20-60

cm, con rizoma strisciante e numerosi rami glabri prostrato-ascendenti e tetragoni. Le foglie piuttosto grandi (2-3 x 4-8 cm) sono opposte, intere, subsessili e persistenti, più grandi nella sommità dei rami. Sono di colore verde scuro superiormente e più chiare sulla pagina inferiore, presentano lamina coriacea e minute punteggiature trasparenti non ghiandolose. I fiori sono grandi, ermafroditi, pentameri, solitari all'apice dei rami, con calice persistente. I petali sono lunghi 3-4 cm, ha 5 stili (dunque 5 logge) diversamente da altre specie di *Hypericum* che ne hanno 3. Il frutto è una capsula ovoidale (20 mm Ø), deiscente a 5 valve, contenente numerosi semi apteri. Molto rustico, tollera tutti i tipi di terreno e di esposizioni, anche in piena ombra e sottobosco, ha sviluppo tappezzante con accrescimento rapido. Si adatta bene sia in luoghi ombrosi che soleggiati, ma a clima mediterraneo, ed è adatto a qualsiasi substrato. Spesso si trova coltivato nei giardini e nei parchi da 0 a 1000 m s.l.m. Fiorisce con continuità da giugno a settembre (actaplantarum.org). In Italia è una specie neofita naturalizzata, presente in Piemonte, Trentino Alto-Adige, Toscana, Marche, Umbria, Lazio, Abruzzo, Campania, Basilicata, Calabria, Sardegna e recentemente anche in Sicilia (Castellano e Spadaro 2010). Di tutti gli iperici è quello con la fioritura più bella, e pertanto viene utilizzato prevalentemente a scopo ornamentale. L'analisi del suo estratto rivela l'assenza di ipericine (Kitanov 2001) e la presenza di oli essenziali (Demirci *et al* 2005). Se ne coltivano 2 accessioni di cui 1 in prova a fini ornamentali.



Fig. 4.1.2.5 - *H. hircinum* fiorito

H. hircinum* L.** subspecie ***majus (Erba di San Giovanni caprina; fig. 4.1.2.5).

È una pianta suffrutescente, quasi un piccolo arbusto, sempreverde, con gemme perennanti, alto fino a 2 m, emanante un forte odore definito di caprone (da cui il nome). Ha fusti eretti e ramosi, i cui giovani rami possono presentare 2-4 linee longitudinali leggermente in rilievo. Le foglie sono opposte e sessili, lunghe 18-35

mm x 5-15 mm, da ovate ad ovato-lanceolate, ottuse all'apice. Sono fittamente punteggiate per la presenza di minute ghiandole traslucide, mentre sono assenti le ghiandole nere (Perrone *et al* 2013a). I fiori, pedunculati, compaiono da maggio ad agosto in cime apicali corimbose ed i petali sono lunghi 14-20 mm, obovati o subellittici. Gli stami numerosi

sono riuniti in 5 fascetti, gli stili eretti e lunghi 3-5 volte l'ovario. Il frutto è una capsula ovato-acuta di 8-10 mm (Fig. 4.1.2.6), deiscente all'apice, contenente numerosi piccoli semi arcuato-subcilindrici con una stretta ala laterale. La specie predilige zone umide e ombrose, dalla zona costiera fino a 1200 m di altitudine e vegeta sia su substrato calcareo che siliceo. In Italia è riportata come presente in Toscana,

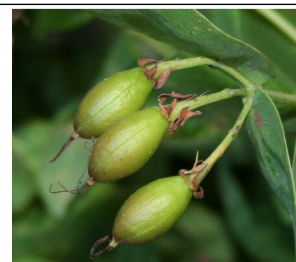


Fig. 4.1.2.6 - capsule di *H.hircinum* subsp. *majus*

Campania, Basilicata e Sardegna, mentre non è stata più ritrovata in Liguria. All'interno della specie, la sottospecie *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson, è segnalata nelle Marche, Campania e Sicilia e si differenzia per le foglie ovato-lanceolate, acute all'apice, più lunghe e con capsula più lunga (actaplantarum.org). Ha un uso terapeutico contro affezioni bronchiali, tosse e mal di gola (Pieroni *et al* 2004) e i suoi oli essenziali lo caratterizzano come antimicrobico (Pistelli *et al* 2000) e antifungino (Bertoli *et al* 2011). Ha anche elevata attività antiossidante e antiradicalica (Mandrone *et al* 2014). Sono in coltivazione 2 accessioni.



Fig. 4.1.2.7 - *H. hirsutum* in fiore

***H. hirsutum* L.** (Erba di S.Giovanni irsuta; Fig. 4.1.2.7).

È una pianta erbacea, alta 40-60 cm, a volte fino al metro, densamente pubescente. Ha un fusto eretto e ramoso in alto ed un rizoma obliquo. Le foglie superiori sono ellittiche, brevemente picciolate, senza ghiandole scure, mentre quelle inferiori spesso presentano all'ascella fascetti di foglie minori. L'infiorescenza, presente da giugno ad agosto, è piramidale, con rami inseriti all'ascella di

foglie normali. I sepali, strettamente lanceolati, hanno sul bordo ciglia ghiandolari, mentre i petali possiedono poche ghiandole nere in prossimità dell'apice. In Italia è presente su quasi tutto il territorio nazionale, manca in Val d'Aosta, Sicilia e Sardegna, ed è in dubbio in Calabria (actaplantarum.org). L'habitat preferenziale della specie è costituito da radure, forre, sponde, vegetazioni ad alte erbe boschive, dal piano fino a 1600 m. Viene riportata come specie antiinfiammatoria da Savikin *et al* (2007), gastroprotettiva da Zdunic *et al*

(2014), ricca in oli essenziali (Maggi *et al* 2010) e contenente solo ipericina e non pseudoipericina (Kitanov 2001). È in coltivazione una sola accessione.



Fig. 4.1.2.8 - *H. montanum* in fiore

***H. montanum* L.** (Erba di S.Giovanni montana; Fig. 4.1.2.8).

È una pianta erbacea perenne, con fusto alto 50-70 cm, eretto, robusto, glabro e ramoso solo nella infiorescenza. Le foglie sono lanceolate (1,5-3 cm x 4-6 cm), le inferiori glauche e più o meno pubescenti, con abbondanti ghiandole nere lungo il margine, quelle superiori anche con ghiandole traslucide. Ha internodi allungati, spesso lunghi fino a 2-4 volte la foglia corrispondente. Fiorisce nei mesi di giugno e luglio, con formazione di corimbi lungamente pedunculati e densi. I sepalì si presentano lanceolati e subdentellati sul bordo, per la

presenza di ciglia lunghe 0,5 mm portanti una ghiandola nera (vedi foto). I petali di 9 – 10 mm sono senza ghiandole nere. In Italia è presente su quasi tutto il territorio nazionale, mentre manca nelle isole; in particolare in Sardegna, dove in passato la pianta è stata segnalata erroneamente. Il suo habitat preferito è quello dei querceti e delle faggete, soprattutto nelle fasi di degradazione, dal piano fino ai 1800 m s.l.m. (actaplantarum.org). Contiene oli essenziali, particolarmente sesquiterpeni (Maggi *et al* 2010) e possiede un elevato contenuto in ipericine ed emodina, che lo rendono di alto valore farmaceutico

(Kusari *et al* 2009). Sono in coltivazione 2 accessioni dell'Italia centrale.

***H. perforiatum* L.** (Erba di S.Giovanni a foglie cordate; fig. 4.1.2.9).

Pianta erbacea perennante alta da 30 a 70 cm, ha fusti brevemente striscianti e quindi eretti, robusti e indivisi fino all'infiorescenza, con internodi lunghi quanto le foglie. Le foglie sono sessili,



Fig. 4.1.2.9 - fiori di *H. perforiatum*

ovato/lanceolate, allargate alla base con piccoli fori in trasparenza in corrispondenza delle ghiandole traslucide, opposte e con nervi non prominenti. I fiori, presenti da aprile a giugno/luglio, sono corimbi apicali di colore giallo, in cui i sepali e i petali provvisti di presentano ghiandole nere sul bordo. In Italia è distribuito in Toscana, Umbria, Lazio, Abruzzo, Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Calabria, Sicilia e Sardegna, ad altitudini da 0 a 1200 m s.l.m., come habitat predilige prati e luoghi aridi, selve boscaglie e siepi (actaplantarum.org). La sua azione terapeutica è totalmente assimilabile a quella di *H. perforatum*, hanno infatti un simile contenuto in ipericine, viene applicato in caso di ferite poiché stimola la creazione di nuovi tessuti e come lenitivo del dolore (Cirak *et al* 2007). Sono in coltivazione 4 accessioni di origine siciliana.



Fig. 4.1.2.10 - *H. perforatum* in fiore

***H. perforatum* L.** (Erba di S.Giovanni; fig. 4.1.2.10).

E' una pianta erbacea perenne con un corto rizoma sotterraneo che produce numerosi fusti, alti fino ad un metro di altezza, lignificati alla base e riccamente ramificati in alto. Le foglie, opposte, sono sessili, di forma ovale o ellittica e gradatamente più piccole e ristrette fino a quelle dei rami che sono ovali-oblunghe. Osservate in trasparenza, presentano nel lembo numerose ghiandole

traslucide che hanno dato alla pianta il nome di “perforatum”. Sul loro bordo sono inoltre presenti ghiandole di colore nero. *H. perforatum* è ripartito in tre sottospecie: *Hypericum perforatum* L. subsp. *angustifolium* (DC.) Gaudin.; *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* e *Hypericum perforatum* L. subsp. *veronense* (Schrank) Frhöllich. In Sicilia, come nel centro Italia, si riscontrano due sottospecie, la più rara subsp. *perforatum* L., con foglie più grandi, picciolate, ovali, e ghiandole nere a forma sferoidale sui petali, e la più comune sottospecie *veronense* (Schrank) Ces., con foglie serrate, lanceolate e sessili, e solo ghiandole nere sferoidali sui petali (Maggi *et al* 2010). I fiori hanno cinque sepali verdi ovali-oblungi e cinque petali ovali-ellittici giallo brillante la cui superficie è spesso macchiata dai punti neri e più chiari delle ghiandole; gli stami, dorati, sono numerosissimi.

L'antesi si prolunga da maggio ad agosto, ma tradizionalmente la raccolta viene effettuata intorno al 21 giugno (giorno di S. Giovanni, da cui il più famoso dei nomi volgari della pianta), momento in cui la droga, rappresentata dalle sommità fiorite, è più ricca in principi attivi. Il frutto è una capsula ovale triloculata, deiscente a maturità: i semi, cilindrici, sono di colore nero o bruno scuro. La specie è diffusa su tutto il territorio italiano, dove cresce spontaneamente nei terreni incolti, nei pascoli, lungo i bordi delle strade, dal livello del mare fino alla zona alpina (actaplantarum.org), il suo areale si estende tuttavia in tutto il mondo, tanto che in vaste aree dell'Australia e del Nord America viene addirittura riportata tra le I.A.S. (Invasives Alien Species), specie infestanti oggetto di numerosi studi tendenti a contenerne la diffusione (Buckley *et al* 2003).

Le numerose proprietà terapeutiche, oggetto di numerosissimi studi, sono già state descritte nell'introduzione. Sono in coltivazione 15 diverse accessioni, di cui 6 di origine siciliana.



Fig. 4.1.2.11 - *H. patulum* in fiore

***H. patulum* Thunb.** (Fig. 4.1.2.11).

È un arbusto cespuglioso sempreverde (perde le foglie solo nei climi più freddi) alto e largo fino a 120 centimetri, con foglie ovato-lanceolate, alterne, di color verde cupo superiormente, glauche nella pagina inferiore, portate da steli rossastri. I fiori, ermafroditi, sono larghi 2-5 centimetri, di colore giallo oro, sono riuniti in racemi terminali e compaiono da giugno a

settembre. Sono grandi, a coppa, di color giallo oro, disposti in gruppetti da 5-6 unità, con stami aranciati, sono impollinati da insetti, ma la pianta è anche auto-fertile. I semi maturano da settembre-novembre. Originaria dell'estremo oriente, il suo habitat ideale sono anfratti ombrosi, a volte sulle rocce e in pendii aperti, a 1500 - 2400 metri (area Himalaya). Cresce bene in posizioni soleggiate o semi-ombreggiate, in tutti i tipi di terreno ben drenati. Interessante per la sua fioritura abbondante e prolungata nel periodo estivo-autunnale. Il colore lucente dei suoi fiori e la sua estrema adattabilità ne hanno determinato il largo impiego per l'arredo urbano (Pfaf.Org). Varietà molto diffusa è *H. patulum* HIDCOTE, adatta ai climi freddi, la temperatura critica è -5°C, ma le piante possono

ricacciare. È in coltivazione una accessione, proveniente dal centro Italia, posta in piena terra e oggetto di valutazione florovivaistica.



Fig. 4.1.2.12 - *H. pubescens* in fiore

***H. pubescens* Boiss.** (Erba di S.Giovanni pubescente; fig. 4.1.2.12)

Piccola pianta erbacea perenne, con fusto strisciante lignificato e rami ascendenti ampiamente ramosi, spesso dalla base. La pubescenza è compatta ed infeltrita sia sul fusto che sulle foglie giovani, le foglie sono larghe 8-11 cm e lunghe 10-19 cm. Sulla lamina fogliare, lungo i margini della foglia, ci sono alcuni grandi noduli neri mentre ghiandole traslucide si trovano su tutta la

superficie della lamina fogliare (Perrone *et al* 2013a). Il fusto è diviso all'infiorescenza che si presenta corimbosa e multiflora. La specie fiorisce con scalarità da aprile a giugno. I sepali, di 5-10 mm, sono acuti e aristati all'apice, ma senza ghiandole, mentre i petali, di 9-15 mm, sono ghiandolosi solo sul bordo. In Italia si trova solo in Sicilia e Sardegna, in ambienti umidi, talora subsalsi, da 0 a 500 m slm.(actaplantarum.org). Secondo Perrone *et al* (2013b) colonizza ambienti umidi, a volte habitat salati, ed è presente in Portogallo e Spagna meridionale, Sicilia e Malta. Non se ne conoscono indicazioni per usi terapeutici. Sono in coltivazione 2 accessioni siciliane.



Fig. 4.1.2.13 - *H. richeri* fiorito

***H. richeri* Vill.** (Erba di S.Giovanni di Belleval; Fig. 4.1.2.13).

Pianta erbacea perennante, alta da 20 a 40 cm, con fusto a sezione rotonda, glabro, robusto, indiviso fino all'infiorescenza, senza ramificazioni. Ha foglie da lanceolate ad ovate-lanceolate, più o meno acute, lunghe 2-4 cm, opposte, sessili, intere e bordate di

piccole ghiandole nere. Foglie decisamente più lunghe dell'internodo soprastante e con nervatura reticolata prominente. L'infiorescenza si presenta in densi corimbi all'apice dello scapo, con fiori a 5 petali di un giallo vivo, di 2,5 - 3 cm, ellittici con punti neri. I sepali sono lunghi 6-8 mm, acuminati, a frange fini, a strie e punti neri. Ha petali 2-3 volte più lunghi del calice. I fiori molto vistosi sono ermafroditi, con stami numerosi raccolti in fascetti e ovario supero. Il frutto è una capsula. È una specie montana ed alpina dell'Europa meridionale, dalla Penisola Iberica ai Balcani ed eventualmente Caucaso o Anatolia. Fiorisce in giugno – agosto. In Italia è distribuita nelle Alpi occidentali e centrali e nell'Appennino settentrionale e centrale dai 1000 ai 2350 m s.l.m. La si trova in praterie, luoghi erbosi, brughiere, megaforbieti, non è molto frequente (actaplantarum.org). Contiene le sole ipericine (Kitanov 2001) e molti oli essenziali (Maggi *et al* 2010). Viene citato come antiinfiammatorio e gastroprotettivo da Savikin *et al* (2007). Solo una accessione è in coltivazione, ma non è arrivata a fiorire, mostra in effetti difficoltà di adattamento, presumibilmente al clima mediterraneo, più caldo e asciutto non appropriato a questa specie.



Fig. 4.1.2.14 - *H. tetrapterum* in fiore

prevalenza del tipo traslucido e poche nere. I corimbi multiflori, presenti da giugno ad agosto, sono costituiti da sepali acuti interi e senza ghiandole, e da petali di 5-7 mm lobati da un lato, raramente con ghiandole nere presenti. La specie è distribuita in tutta Italia, da 0 a 800 m s.l.m, e predilige soprattutto luoghi umidi quali paludi,

***H. tetrapterum* Fr.** (Erba di S.Giovanni alata; fig. 4.1.2.14).

È una pianta erbacea perennante, glabra, alta da 20 a 70 cm, con fusto prostrato solo alla base e quindi ramoso e quadrangolare, con agli angoli ali larghe 0,5 mm (da cui il nome). Le foglie, sempre glabre, sono dimorfe a maggioranza ellittiche, di 5 x 15 mm (a volte 15 x 25), con ghiandole in



Fig. 4.1.2.15 - Habitat naturale di *H. tetrapterum* (Floresta, ME)

sponde e canneti (actaplantarum.org). Possiede alti contenuti in iperforina e quercitrina (Smelcerovic *et al* 2006) ed in oli essenziali (Maggi *et al* 2010). In coltivazione solo una accessione proveniente dal centro Italia.

4.1.3 Caratterizzazione chimica

I risultati relativi alle rese in estratto e al contenuto in metaboliti attivi delle accessioni di *Hypericum* spp. reperite negli anni 2013-2014, vengono riportati nelle tabelle 4.1.3.1 e 4.1.3.2, la prima contenente i dati riguardanti le sole accessioni della specie *Hypericum perforatum*, e l'altra comprendente tutte le altre specie di *Hypericum* sottoposte a valutazione nel corso della prova.

In tab. 4.1.3.1 si riportano i dati relativi a 27 campioni, alcuni dei quali prelevati direttamente dalle stazioni di vegetazione spontanea (20), altri derivanti da allevamento in vaso (7).

La tabella evidenzia l'esistenza di un'ampia variabilità intraspecifica, con quantitativi di ipericina, iperforina e pseudoipericina assai diversi secondo il genotipo. In linea generale, tra i campioni esaminati si distinguono come più povero in componenti attive quello proveniente da M. Petroso (PA), e come campione più ricco quello di Contessa Entellina (PA). Un primo confronto tra campioni raccolti da piante allo stato spontaneo e da piante coltivate in vaso mostra, tuttavia, che nel primo raggruppamento la variabilità dei metaboliti è molto ampia (da 0,08 a 1,52 g kg⁻¹ di s.s. per ipericina, da 0,09 a 1,41 g kg⁻¹ di s.s. per pseudoipericina e da 2,21 a 30,31 g kg⁻¹ di s.s. per iperforina), mentre al contrario, nel secondo gruppo il range di variazione è più contenuto (da 0,13 a 0,95 g kg⁻¹ di s.s. per ipericina, da 0,15 a 0,92 g kg⁻¹ di s.s. per pseudoipericina e da 5,34 a 18,34 g kg⁻¹ di s.s. per iperforina). Analoga variazione si riscontra a carico della resa in estratto, in cui lo scarto tra valori minimi e massimi è maggiore nei campioni raccolti dalle popolazioni spontanee (dal 9,20-35,5 % al 14,6 – 30,9%).

Tabella 4.1.3.1 - Determinazioni analitiche svolte sulle accessioni di <i>H. perforatum</i> in prova.								
Accessioni di <i>H. perforatum</i>	Resa in estratto (%)		Iperforina (g kg ⁻¹ s.s.)		Pseudoipericina (g kg ⁻¹ s.s.)		Ipericina (g kg ⁻¹ s.s.)	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
Capogallo	16,9	33,6	5,70	5,37	0,11	1,41	0,11	1,52
Piano Ferro (PA)	13,6	28,1	3,79	2,81	-	0,61	-	0,53
Piano Marcato (PA)	19,1	26,2	3,42	5,31	0,22	0,65	0,25	0,65
M. Petroso (PA)	14,7	-	2,21	-	0,10	-	0,08	-
Pomieri (PA)	20,0	-	17,68	-	0,45	-	0,60	-
Macee (AR)	20,5	28,9	2,22	1,66	0,10	0,46	0,19	0,38
Loscove (AR)	23,4	34,0	7,06	4,92	0,20	0,64	0,78	0,61
Camaldoli (AR)	12,6	20,0	2,54	3,28	0,09	0,51	0,16	0,20
Marino (RM)	9,2	-	3,62	-	0,22	-	0,27	-
Vicaretto (PA)	18,7	-	10,68	-	0,32	-	0,67	-
Contessa E.na (PA)		35,5	-	30,31	-	0,55	-	0,34
Ucria (ME)		34,5	-	8,91	-	1,36	-	0,79
Polizzi (PA)		31,6	-	3,71	-	0,76	-	0,60
Blufi (PA)		33,5	-	2,94	-	0,89	-	0,64
Pian Occhio II (PA)		34,3	-	15,05	-	0,36	-	0,33
Buiano (AR)		26,6	-	11,68	-	0,67	-	0,57
Consuma (FI)		23,6	-	3,59	-	1,00	-	0,70
Borselli (FI)		23,4	-	3,23	-	0,64	-	0,57
Pratomagno (AR)		20,5	-	5,84	-	1,12	-	0,38
Media spontanee	16,9	29,0	5,89	7,24	0,20	0,78	0,35	0,59
Cammarata (AG)*	19,8	27,3	18,34	15,28	0,51	0,55	0,40	0,32
Orto botanico SI*	14,6	24,8	5,96	7,57	0,29	0,58	0,24	0,23
Orto botanico TN*	18,6	30,9	5,34	6,30	0,34	0,92	0,22	0,26
Orto botanico AN*	-	27,6	-	4,86	-	0,31	-	0,29
Orto botanico NA*	-	25,3	-	3,95	-	0,84	-	0,95
Orto botanico RM*	-	29,8	-	4,36	-	0,79	-	0,43
Orto botanico IS*	18,6	26,6	7,34	5,63	0,15	0,81	0,13	0,35
Media coltivate	17,9	27,5	9,25	6,85	0,32	0,69	0,25	0,40
Media <i>H. perforatum</i>	17,2	28,5	6,85	7,12	0,24	0,75	0,32	0,53
*: accessioni allevate in vaso								

Tenendo presente comunque che in commercio l'estratto secco da sommità fiorite viene titolato in base al suo contenuto in ipericine (ipericina e pseudoipericina) che deve essere pari allo 0,3% (Farmacopea europea), e che per entrare in commercio l'*Hyperici herba* deve avere una quantità minima di ipericina totale pari allo 0,04% (Wagner e Bladt, 1994), i campioni analizzati risultano essere tutti di alta qualità. I comuni preparati derivati da *H. perforatum* contengono concentrazioni standardizzate con lo 0,3% di ipericine e il 3% di iperforine (Saxena *et al* 2007).

L'iperforina, principio attivo attualmente riconosciuto di grande importanza, ma le cui quantità standard nei fitoterapici non sono ancora definite, e che risulta essere normalmente presente con valori 10 volte superiori a quelli delle ipericine nell'analisi della droga grezza, viene riscontrato in quantità molto elevate in almeno 5 accessioni siciliane, meritevoli in futuro di indagini specifiche.

Nella tabella 4.1.3.2 sono riassunti i valori delle analisi sulle altre specie del genere *Hypericum* indagate.

Tabella 4.1.3.2 – Determinazioni analitiche svolte su specie di <i>Hypericum</i> diverse da <i>H. perforatum</i>									
Accessioni di <i>Hypericum</i> spp.		Resa in estratto (%)		Iperforina (g kg⁻¹ s.s.)		Pseudoipericina (g kg⁻¹ s.s.)		Ipericina (g kg⁻¹ s.s.)	
Specie	Provenienza	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
<i>H. perforatum</i>	Capogallo (PA)	14,70	23,08	10,46	10,40	0,65	1,44	0,20	0,47
	M. Catalfano (PA)	15,20	23,89	0,39	0,94	0,02	0,42	0,02	0,46
	P. Sempria (PA)	-	32,01	-	11,16	-	1,04	-	0,43
	M. Cammarata (AG)	11,40	20,67	0,63	3,31	0,61	0,68	0,22	0,40
	S. Maria d.B. (ME)	-	26,26	-	1,05	-	1,26	-	0,30
	Ucria (ME)	-	15,57	-	13,00	-	1,05	-	0,25
	Polizzi G.sa (PA)	-	23,34	-	0,10	-	0,96	-	0,32
	P. d. Occhio (PA)	-	16,70	-	17,34	-	0,37	-	0,09
Media		13,77	22,69	3,83	7,16	0,43	0,90	0,15	0,34
<i>H. tetrapterum</i>	Orto botanico RM	-	29,14	-	3,30	-	0,84	-	0,25
	Floresta (ME)	18,50	-	3,99	-	0,43	-	0,54	-
	Stia (AR)	20,70	-	9,38	-	0,58	-	0,84	-
Media		19,60	29,14	6,69	3,30	0,51	0,84	0,69	0,25
<i>H. montanum</i>	Orto botanico AN	-	25,48	-	0,31	-	0,45	-	0,42
	Camaldoli (AR)	-	23,05	-	0,14	-	0,38	-	0,41
Media		-	24,27	-	0,23	-	0,42	-	0,42
<i>H. pubescens</i>	Mazara (TP)	-	35,02	-	0,27	-	0,55	-	0,05
	Palermo (PA)	-	24,11	-	2,77	-	1,05	-	0,41
Media		-	29,57	-	1,52	-	0,80	-	0,23
<i>H. calycinum</i>	Ucria (ME)	-	33,82	-	0,43	-	0	-	0
<i>H. hirsutum</i>	Orto botanico SI	11,70	-	0,19	-	0,02	-	0,02	-
<i>H. hircinum</i>	Sinagra (ME)	-	18,53	-	0,60	-	0	-	0

Un primo interessante raffronto si può effettuare tra le 8 accessioni di *H. perfoliatum*, tutte di origine siciliana.

Anche in questa specie la quantità dei 3 metaboliti indagati è molto variabile (figure 4.1.3.1 e 4.1.3.2), ed anche qui il contenuto in iperforina rilevato è mediamente 10 volte più elevato delle ipericine, come riscontrato in letteratura, e similmente alla specie *H. perforatum*.

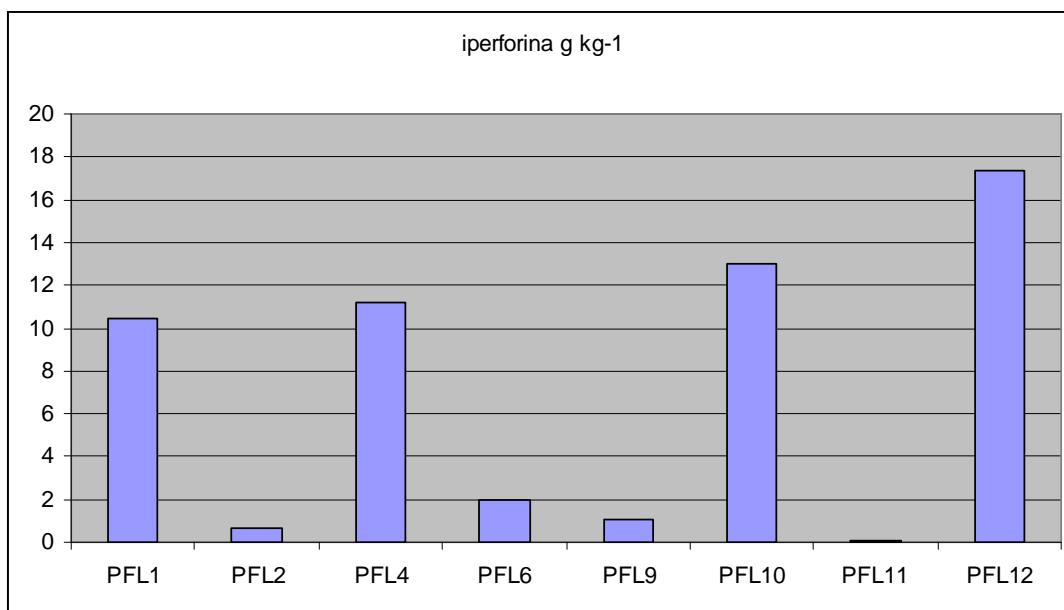


Figura 4.1.3.1 Contenuti di iperforina nelle accessioni di *H. perfoliatum*

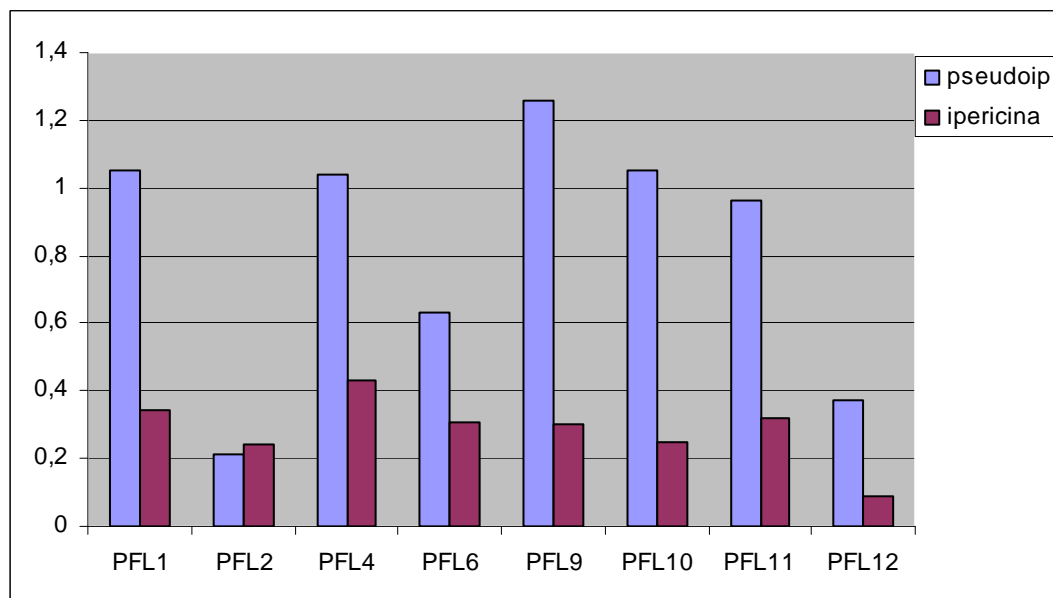


Figura 4.1.3.2 Contenuti di ipericine (g kg⁻¹) nelle accessioni di *H. perfoliatum*

Entrando più in particolare sui contenuti in ipericine (ipericina e pseudoipericina) si nota che sono soprattutto i quantitativi di pseudoipericina ad essere più elevati, ma nel

complesso i campioni possiedono comunque quantitativi di molto superiori (la loro media è $1,1 \text{ g kg}^{-1}$ di s.s.) rispetto quelli richiesti dal mercato.

H. perfoliatum mostra dunque valori del tutto assimilabili a quelli di *H. perforatum* e da questo punto di vista può divenirne un'alternativa.

Un confronto tra tutte le specie indagate permette di distinguere meglio le differenze interspecifiche. La tabella 4.1.3.2 mostra complessivamente i quantitativi medi emersi per ciascuna specie. Riguardo alle rese in estratto, è possibile notare in primo luogo il basso valore di *H. hirsutum* seguito da *H. hircinum*, e l'alta resa di *H. calycinum* e dell'accessione mazaese di *H. pubescens* nel 2014.

Quasi del tutto assente risulta l'iperforina nelle specie *H. hirsutum*, *H. montanum*, *H. calycinum* e *H. hircinum*, mentre quantitativi pressoché equivalenti se ne riscontrano in *H. perfoliatum*, *H. perforatum* e, in una delle due annate, in *H. tetrapterum*. Una delle accessioni di *H. perfoliatum* (Piano dell'Occhio, PA), con $17,34 \text{ g kg}^{-1}$, risulta essere la più ricca.

Le ipericine invece, praticamente assenti in *H. hircinum*, *H. calycinum* e *H. hirsutum*, sono ben rappresentate nelle altre specie.

Il contenuto in pseudoipericina in letteratura risulta in generale essere almeno 2-4 volte superiore a quello dell'ipericina, con ampi margini di variazione tra le specie (Karioti e Bilia 2010).

Kitanov (2001) riporta come valori rilevati in campioni vegetali provenienti dalla Turchia contenuti di ipericine medi di 0,125 % in *H. perforatum*, di 0,054 % in *H. montanum*, di 0,052 % in *H. tetrapterum* e di 0,043% in *H. hirsutum* su estratto secco. Anche Savikin (2007) riporta valori di ipericine su *H. hirsutum* (0,107 %) che si discostano da quelli rilevati nel corso della presente indagine. Smelcerovic *et al* (2006) riportano per *H. tetrapterum* rispettivamente 0,11, 0,10 e 0,09 mg g^{-1} di iperforina, pseudoipericina e ipericina, e per *H. hirsutum* 0,06, 0 e 0,04 mg g^{-1} di iperforina, pseudoipericina e ipericina. Anche sulle altre specie, come per *H. perforatum*, si ripropone la problematica della estrema variabilità dei contenuti in metaboliti riscontrata e riportata in bibliografia.

A parte *H. calycinum*, *H. hircinum* e *H. hirsutum* le altre 5 specie analizzate risultano essere tutte interessanti per il loro contenuto in ipericine. Queste 3 specie, caratterizzate dal basso tenore in naftodiantroni e fluoroglucino, sono comunque oggetto di valutazioni fitoterapiche per il loro contenuto in altri principi bioattivi (Maggi *et al* 2010, Smelcerovic *et al* 2006).

4.1.4 Caratterizzazione molecolare

L'indagine svolta ha riguardato taxa appartenenti a tutte le specie presenti nella regione Sicilia, ad eccezione di *H. australe*, non disponibile. *H. androsaemum* e *H. triquetrifolium*, pur presenti in Sicilia provengono dall'erbario dell'orto botanico di Palermo mentre gli altri campioni sono stati raccolti direttamente sul luogo di vegetazione spontanea; la tabella 4.1.4.1 elenca le 9 specie e 2 sottospecie reperite ed analizzate.

Tabella 4.1.4.1 – Caratterizzazione molecolare di <i>Hypericum</i> spp. siciliani. Taxa indagati e località di reperimento.			
taxa analizzati	località	coordinate	Altit. s.l.m.
<i>H. aegypticum</i>	Lampedusa, (AG)	35°29'45" N, 12°36'15" E	16 m
<i>H. androsaemum</i>	Parco Madonie (PA)	37°52'0,4" N, 14°04'08" E	1395 m
<i>H. calycinum</i>	Ucria (ME)	38°03'05" N, 14°54'59" E	718 m
<i>H. hircinum</i> subsp. <i>majus</i>	Monforte S.Giorgio (ME)	38°12'75"N, 15°19'67" E	5 m
<i>H. perfoliatum</i>	Monte Catalfano (PA)	38°06'51" N, 13°17'29" E	73 m
<i>H. perforatum</i> subsp. <i>perforatum</i>	Monte Etna (CT)	37°38'03" N, 15°01'25" E	895 m
<i>H. perforatum</i> subsp. <i>veronense</i>	Capo Gallo (PA)	38°12'43" N, 13°17'39" E	25 m
<i>H. pubescens</i>	Campobello di Mazara (TP)	37°39'09" N, 12°46'21" E	145 m
<i>H. tetrapterum</i>	Floresta (ME)	37°59'34" N, 14°54'12" E	1360 m
<i>H. triquetrifolium</i>	Valle Anapo, Sortino (SR)	37°08'00" N, 14°59'31" E	457 m

A seguito delle analisi eseguite, in tabella 4.1.4.2 viene riportata la performance di ciascun marcatore testato.

Il livello percentuale di risoluzione per specie è calcolato sulle sequenze ottenute con successo.

Il locus ***rbcL*** ha mostrato le migliori prestazioni in termini di successo di amplificazione e sequenziamento, mentre i marcatori ***trnH-psbA*** e ***mat K*** hanno mostrato un maggiore potenziale nella risoluzione a livello di specie (Tabella 4.1.4.2).

In particolare, ***trnH-psbA*** ha discriminato il 100% dei taxa sequenziati con successo. Pertanto, un approccio multi-locus (*rbcL* + *trnH-psbA*), in grado di risolvere l'80% dei taxa analizzati (8/10), è apparso il miglior compromesso tra il risultato di sequenziamento e il potere di discriminazione.

Tabella 4.1.4.2 – Performance di ogni marcatore barcoding testato, in singolo e in multi-locus su <i>Hypericum</i> spp						
	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL+matK</i>	<i>rbcL+trnH-psbA</i>	<i>matK+trnH-psbA</i>
Successo PCR	100% (10/10)	60% (6/10)	80% (8/10)	-	-	-
Successo sequenziamento (<i>contigs</i>)	90% (9/10)	83% (5/6)	87% (7/8)	-	-	-
Qualità sequenze (<i>contigs</i>)	91%	81%	84%	-	-	-
Lunghezza media frammento (bp)	529	813	498	-	-	-
Risoluzione a livello di specie	55% (5/9)	80% (4/5)	100% (7/7)	70% (7/10)	80% (8/10)	70% (7/10)
Distanza Genetica (K2P%)	2,1	9,5	9,5	-	-	-
N (numero totale sequenze comparate)	23	14	26	-	-	-
Numero siti variabili	55/529	222/813	253/751	-	-	-

In accordo con i risultati esposti in tabella 4.1.4.2, gli alberi filogenetici di ogni marcatore barcoding hanno mostrato chiaramente la relazione genetica tra i taxa inclusi in questo studio (figg. 4.1.4.1-2-3).

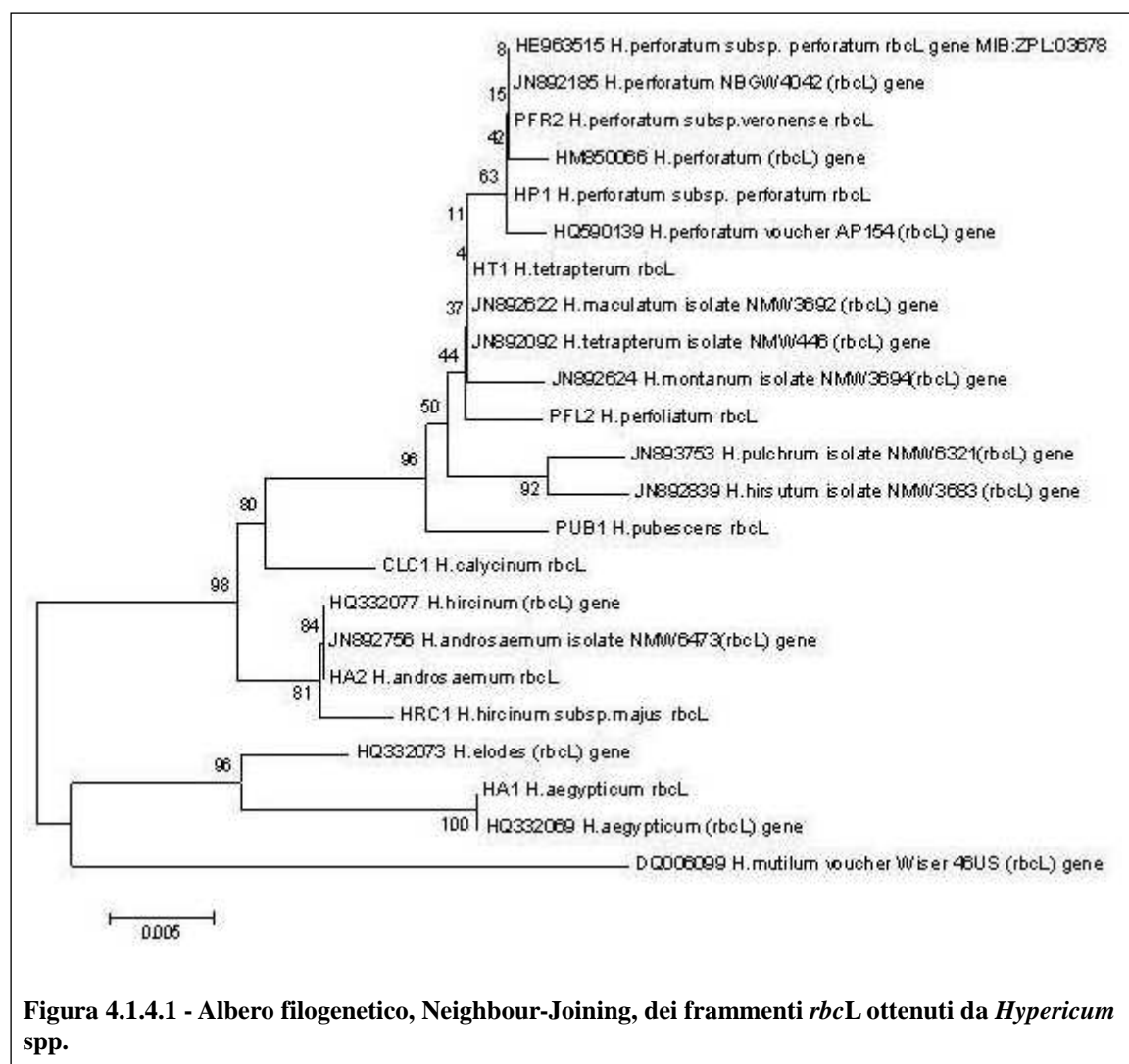


Figura 4.1.4.1 - Albero filogenetico, Neighbour-Joining, dei frammenti *rbcL* ottenuti da *Hypericum* spp.

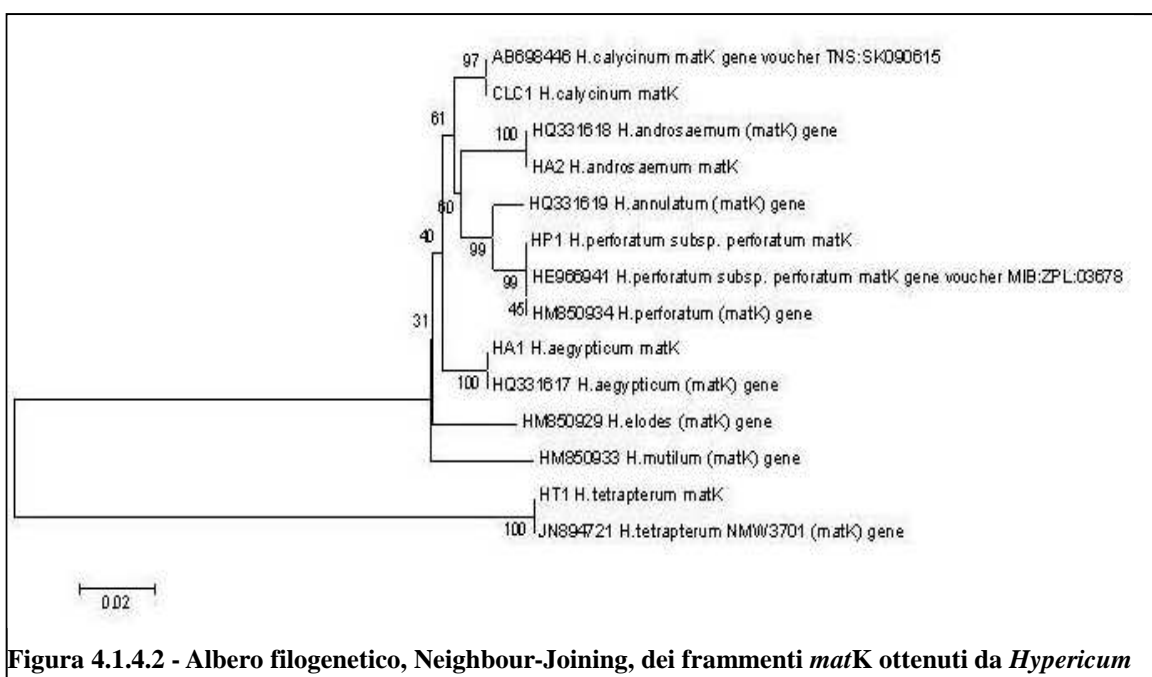
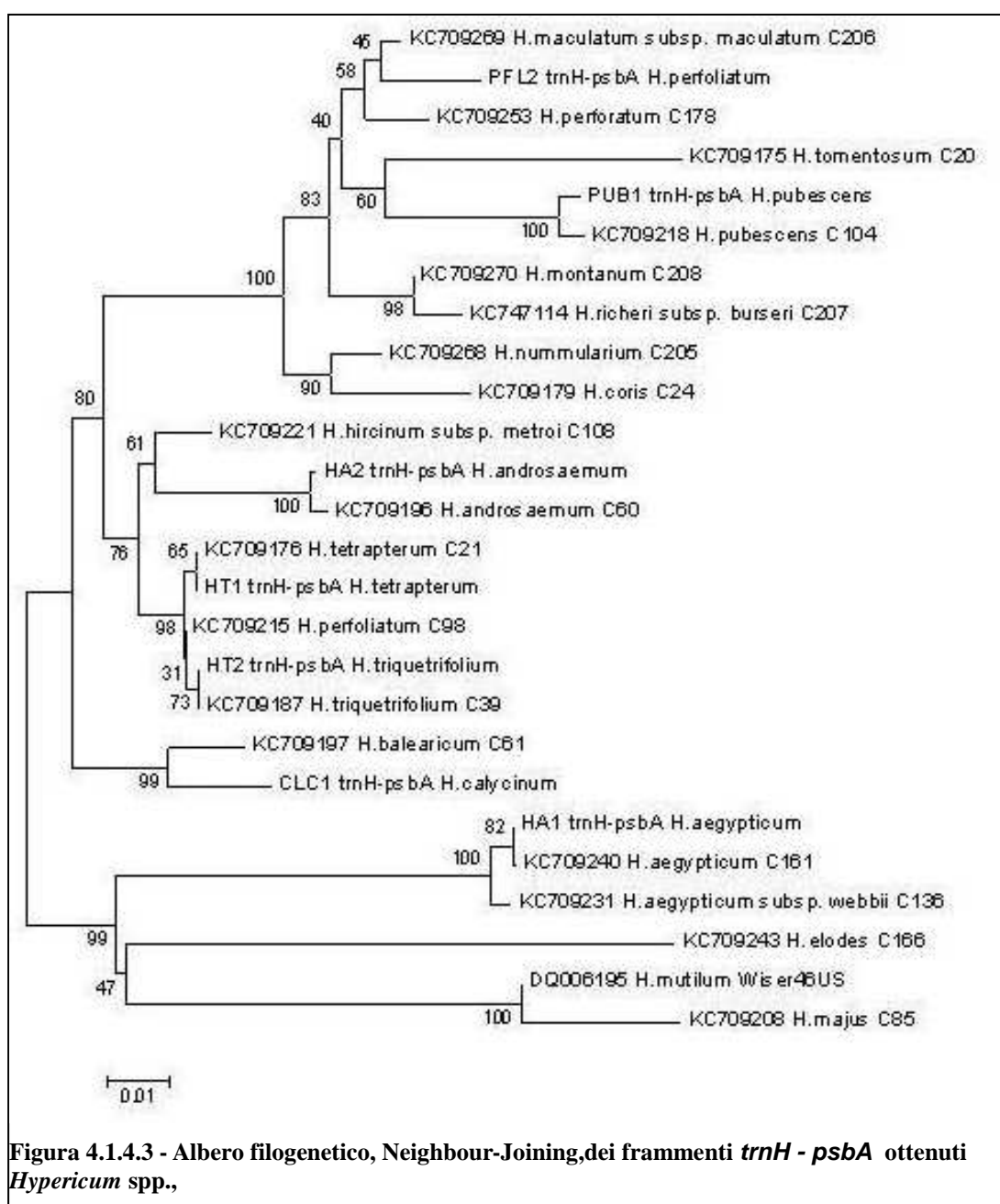


Figura 4.1.4.2 - Albero filogenetico, Neighbour-Joining, dei frammenti *matK* ottenuti da *Hypericum*



Solo due sottospecie di *H. perforatum*, la subsp. *perforatum* e la subsp. *veronense*, non sono state discriminate, ma ulteriori analisi sono in corso per ripetere l'amplificazione *trnH-psbA*, che non è riuscita in una prima fase.

I risultati molecolari confermano il potenziale dell'approccio del DNA barcoding nel discriminare i taxa del genere *Hypericum*, garantendo velocità del sistema ed accuratezza dell'identificazione.

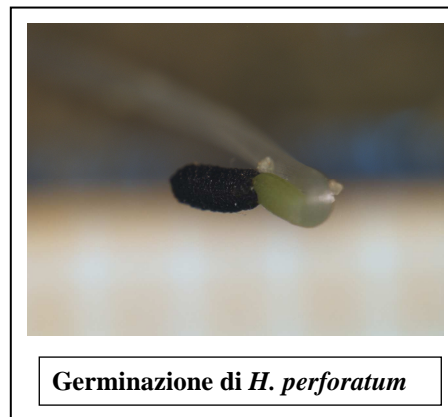
È stata creata inoltre la banca del DNA e delle sementi correlate alle specie vegetali selezionate.

4.2 STUDIO DI ALCUNI ASPETTI DELL'AGROTECNICA

4.2.1 Moltiplicazione gamica

- Germinazione in vitro

La tabella 4.2.1.1 riporta i risultati dei test di germinazione preliminari svolti su semi di *Hypericum perforatum* vernalizzati e non vernalizzati, sottoposti a differenti temperature. La prova ha in primo luogo evidenziato l'esistenza di marcate differenze nella germinazione dei semi per effetto della vernalizzazione, con una percentuale di germinazione nei semi vernalizzati notevolmente superiore rispetto a quella misurata nelle corrispondenti tesi non vernalizzate.



Entro i due trattamenti principali, le temperature hanno avuto un ruolo cruciale nel determinare la germinazione del seme. In particolare, questa è apparsa inibita sia dalle temperature più basse (10 °C) che da quelle più elevate (25 °C), sebbene ad un livello diverso.

Tabella 4.2.1.1 - effetto della vernalizzazione e di temperature differenti sulla germinazione del seme di *H. perforatum* a 5 e 8 gg dalla semina.

trattamento	Temperatura (°C)	(% di germinazione)	
		5 gg	8 gg
non vernalizzati	10	0,0	0,0
	15	0,0	0,0
	20	0,0	0,0
	25	0,0	1,0
Media non vernalizzati		0,0	0,3
vernalizzati	10	0,0	0,0
	15	0,5	38,1
	20	24,4	46,7
	25	24,0	27,0
Media vernalizzati		12,2	27,9

L'effetto sulla germinazione dell'incremento delle temperature non è stato costante, ed è verosimile che a 25°C ci si approssimi all'inibizione della vitalità del seme (limite massimo di germinazione); per contro, il minimo di germinazione sembra poter essere collocato tra 10 e 15 °C.

Le tabelle 4.2.1.2 e 4.2.1.3 riportano, per ambedue le temperature esaminate, l'andamento della germinazione dei semi al variare del tipo di substrato ed in presenza o assenza

dell'inoculo con *Pseudomonas fluorescens*, ceppo 6560 (PGPR); i risultati dell'ANOVA eseguita sui dati vengono invece riportati in tab. 4.2.1.4.

Tabella 4.2.1.2 - effetto del tipo di substrato e del trattamento con PGPR sulla germinazione del seme di <i>H. perforatum</i> a 15 °C							
substrato	trattamento	25/06/12	05/07/12	09/07/12	12/07/12	16/07/12	20/07/12
agar	sterile	0,0	52,8	16,7	11,1	19,4	0,0
	sterile+PGPR	0,0	35,1	21,6	21,6	13,5	8,1
sabbia	non sterile	0,0	45,5	9,1	9,1	36,4	0,0
	sterile	0,0	59,3	22,2	0,0	14,8	3,7
	sterile+PGPR	0,0	8,3	33,3	16,7	41,7	0,0
torba	non sterile	0,0	81,8	9,1	0,0	9,1	0,0
	sterile	0,0	55,6	11,1	11,1	0,0	22,2
	sterile+PGPR	0,0	66,7	25,0	8,3	0,0	0,0

Tabella 4.2.1.3 - effetto del tipo di substrato e del trattamento con PGPR sulla germinazione del seme di <i>H. perforatum</i> a 25 °C									
substrato	trattamento	01/06/12	13/06/12	15/06/12	21/06/12	27/06/12	04/07/12	07/07/12	16/07/12
agar	sterile	0,0	28,3	3,1	9,4	33,3	25,2	0,6	0,0
	sterile+PGPR	0,0	35,5	2,9	6,5	34,8	19,6	0,7	0,0
sabbia	non sterile	0,0	52,0	6,0	26,0	4,0	6,0	6,0	0,0
	sterile	0,0	47,1	11,8	19,6	2,0	11,8	7,8	0,0
	sterile+PGPR	0,0	38,8	14,3	24,5	10,2	12,2	0,0	0,0
torba	non sterile	0,0	43,8	6,3	28,1	9,4	9,4	0,0	3,1
	sterile	0,0	37,1	8,6	22,9	14,3	17,1	0,0	0,0
	sterile+PGPR	0,0	40,7	7,4	25,9	7,4	11,1	0,0	7,4

Tabella 4.2.1.4 - <i>H. perforatum</i>. Risultati dell'ANOVA eseguita sui dati rilevati.							
Effetto	GDL numeratore	15 °C			25 °C		
		GDL denominatore	<i>F</i>	Pr> <i>F</i>	GDL denominatore	<i>F</i>	Pr> <i>F</i>
Trattamento microbico (M)	2	12	1,28	0,31	12	0,28	0,76
Substrato (S)	2	12	1,50	0,26	12	1,93	0,19
Tempo (T)	1	223	33,40	<,001	370	272,57	<,0001
S*M	3	11	1,05	0,41	18	0,53	0,67
T*M	2	223	0,26	0,77	370	1,28	0,28
T*S	2	223	3,43	0,03	370	82,5	<,0001
T*M*S	3	223	0,35	0,79	370	1,21	0,31

In generale, i trattamenti applicati hanno avuto effetti modesti sui pattern di germinazione. L'ANOVA eseguita ha infatti evidenziato variazioni statisticamente significative solamente a carico del fattore tempo (T) e dell'interazione di questo con il fattore substrato (TxS), a dimostrazione del fatto che la scelta di substrati diversi influenza l'andamento della germinazione nel tempo più che il numero totale di semi germinati. Pur in assenza di una decisa risposta all'analisi statistica per ambedue i fattori, i dati rilevati sulla germinazione dei semi sembrano mostrare una maggiore influenza del substrato rispetto al trattamento microbico; riguardo a quest'ultimo fattore, la presenza di batteri, sia naturali (trattamenti non sterili), sia inoculati (trattamenti sterili + PGPR) sembra addirittura ridurre la germinazione.

Come atteso, inoltre, l'effetto dei diversi trattamenti sulle percentuali di germinazione cumulate nel tempo è stato più pronunciato nelle tesi sottoposte a temperature più alte.

Qualche informazione aggiuntiva può comunque essere tratta dall'osservazione dei dati in tabella 4.2.1.5, in cui vengono riportati i valori della significatività dei confronti a coppie tra i conteggi effettuati al termine della prova, rispettivamente per ogni substrato, sottoposto o non sottoposto al trattamento con PGPR (interazioni T x M) e per i 2 livelli termici a cui i semi sono stati sottoposti (15 °C e 25 °C). Di fatto, i diversi trattamenti hanno esercitato sul valore cumulato di germinazione degli effetti non sempre costanti. In particolare, *Pseudomonas fluorescens* (Pf) non ha manifestato alcun effetto evidente sul valore finale della germinazione in agar a 15 °C, mentre un effetto significativo dello stesso è evidente nella determinazione delle differenze della germinazione nei semi posti in sabbia o torba (confronti 1, 9 e 14). Analoghi risultati sono stati trovati riguardo alla sterilizzazione dei substrati (sabbia e torba), e relativamente all'effetto della completa eliminazione della microflora presente (confronti 6 e 12). Al contrario, le differenze tra i substrati (agar vs sabbia, agar vs torba e sabbia vs torba) sono apparse quasi sempre significative ad entrambe le temperature di incubazione del seme, con valori complessivamente più elevati nei substrati nei quali l'acqua è trattenuta con minor forza rispetto ai mezzi più igroscopici.

Tabella 4.2.1.5 – Differenze delle medie dei minimi quadrati (confronti a coppie) per il valore totale di germinazione dei semi di *H. perforatum* sottoposti a temperature di 15° C e 25 ° C. Pf indica l'inoculo della piastra con *Pseudomonas fluorescens* dopo la sterilizzazione del substrato.

						Pr> t	
Confronto	Substrato	Trattamento microbico	vs	Substrato	Trattamento microbico	15 °C	25 °C
1	Agar	Sterile	vs	Agar	Sterile+Pf	0,443	0,037
2			vs	Sabbia	Sterile	0,041	<,001
3			vs	Torba	Sterile	0,001	<,001
4		Sterile+Pf	vs	Sabbia	Sterile+Pf	<,001	<,001
5			vs		Sterile+Pf	0,001	<,001
6	Sabbia	Non sterile	vs	Sabbia	Sterile	0,002	0,895
7			vs		Sterile+Pf	0,741	0,621
8			vs	Torba	Non sterile	0,001	0,002
9		Sterile	vs	Sabbia	Sterile+Pf	0,003	0,717
10			vs	Torba	Sterile	0,043	0,004
11		Sterile+Pf	vs		Sterile+Pf	0,546	<,001
12	Torba	Non sterile	vs	Torba	Sterile	0,024	0,741
13			vs		Sterile+Pf	0,004	0,269
14		Sterile	vs		Sterile+Pf	0,332	0,157

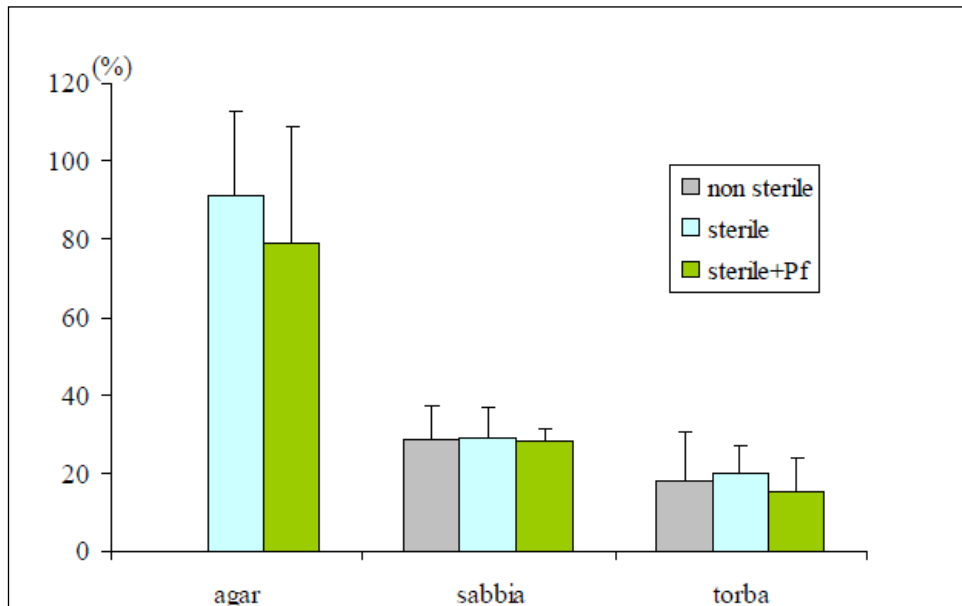
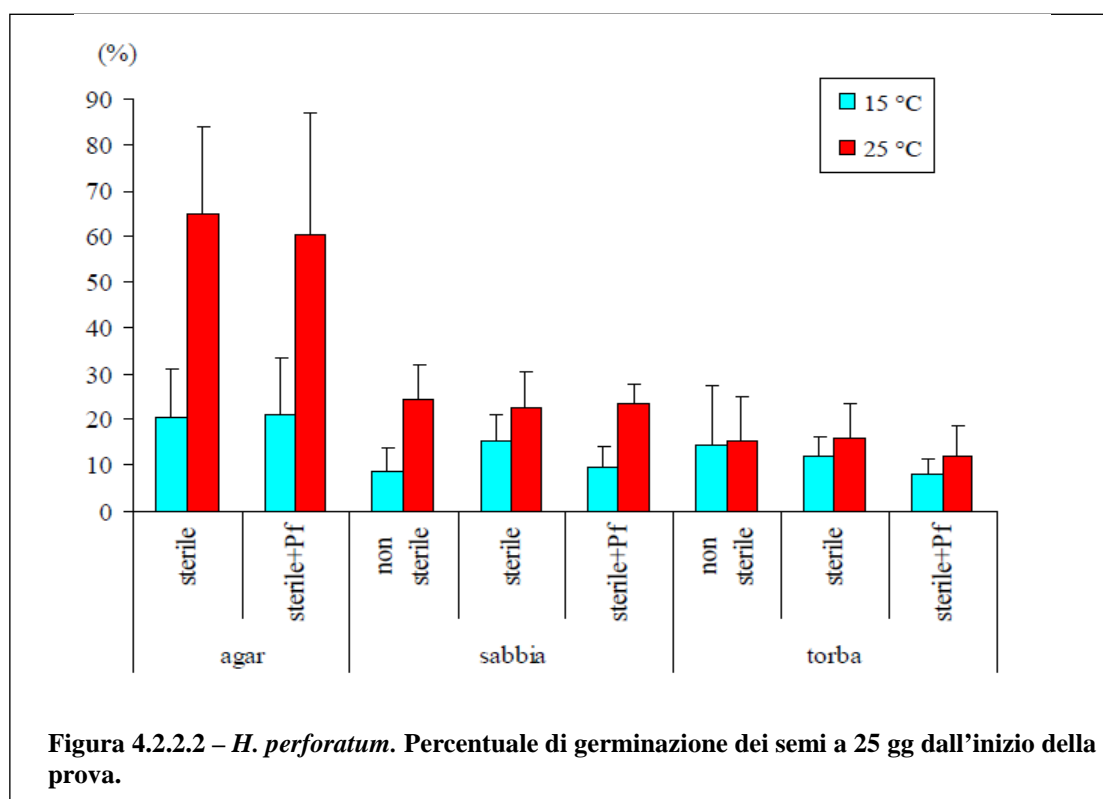
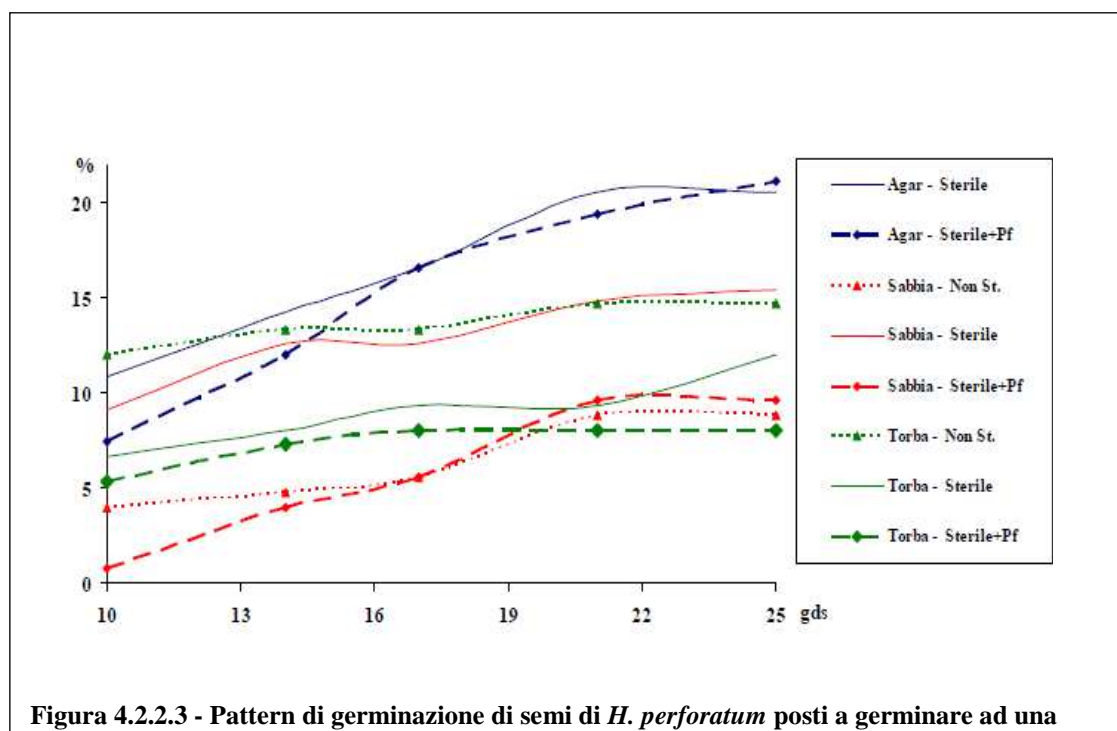


Fig. 4.2.2.1 - *H. perforatum*. Percentuale di germinazione dei semi al termine della prova nelle tesi sottoposte a 25 °C. Pf indica l'inoculo della piastra con *Pseudomonas fluorescens* dopo la sterilizzazione del substrato.

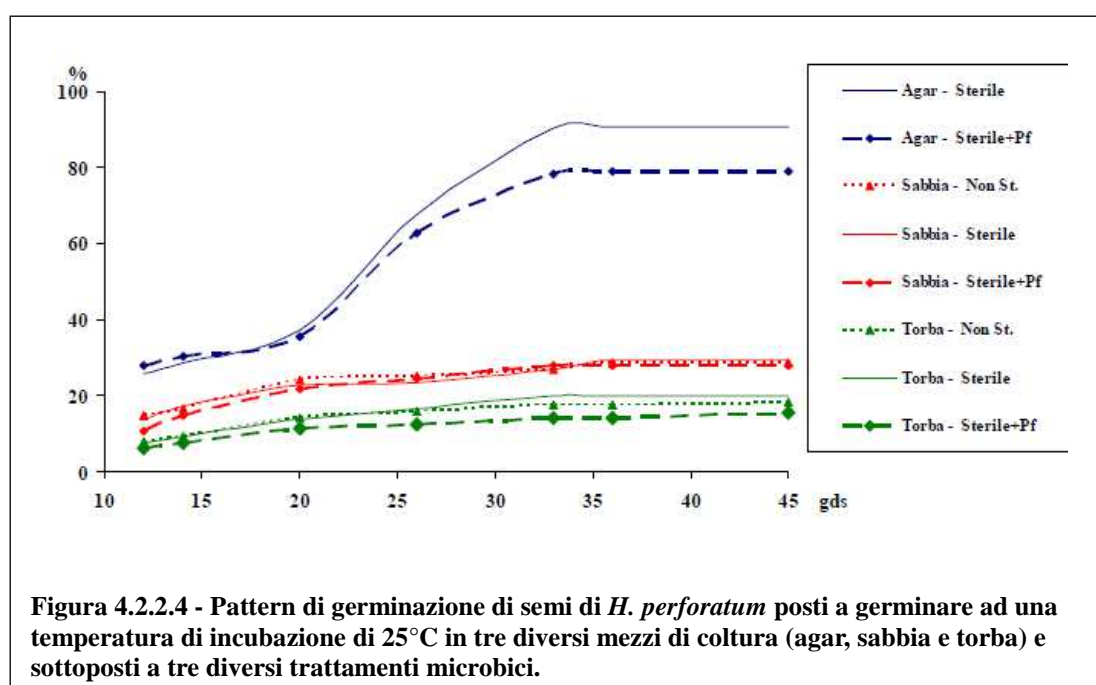


L'inoculo dei substrati con *P. fluorescens* ha generalmente comportato, rispetto alle corrispondenti tesi non inoculate, una marcata riduzione della germinazione totale. Tale diminuzione, che nei trattamenti sottoposti alle temperature più elevate ha raggiunto valori pari al 13% nei semi posti a germinare in agar, al 4% in sabbia ed al 23% in torba (Fig. 4.2.2.1), si è manifestato con evidenza ancora maggiore alla temperatura di incubazione più bassa, soprattutto in sabbia e torba (in media -35.5% rispetto alle tesi sterilizzate e non inoculate; fig. 4.2.2.2). E' verosimile che questo risultato sia dipeso dalla capacità del



batterio di proliferare in questi substrati, di conseguenza sottraendo al seme in germinazione acqua ed elementi nutritivi, il che potrebbe avere in qualche modo ostacolato il processo germinativo, come anche mostrato in altre specie da Evans e Etherington (1990). L'andamento nel tempo della germinazione dei semi in ciascuno dei trattamenti viene mostrato, rispettivamente per i due livelli termici, in fig. 4.2.2.3 (15 °C) e in fig. 4.2.2.4 (25 °C). L'effetto inibitorio del trattamento microbico si mostra in assoluta evidenza in tutti i momenti di rilievo nelle tesi sottoposte a temperature di 15 °C, mentre nelle tesi sottoposte a temperature di 25 °C si distacca nettamente dagli altri l'andamento della germinazione dei semi posti in agar, i quali, peraltro, hanno mostrato la percentuale di germinazione più alta.

Lo *Pseudomonas* utilizzato in questo studio è un batterio promotore della crescita che



predilige pH intorno a 6 e presenta una elevata attività proteolitica, la quale è massima a temperature di crescita comprese tra 15 °C e 20 °C (Gugi *et al* 1991). È possibile che nel presente lavoro, l'attività proteolitica di *P. fluorescens* abbia interferito con il processo di germinazione, ostacolandone il compimento. Ciò può dipendere dall'attività dei batteri nei mezzi (competizione per le risorse o più probabilmente secrezione di metaboliti che riducono la vitalità della plantula).

- Germinazione *in vivo*

L'emergenza delle plantule a partire da seme non vernalizzato è stata piuttosto scarsa (inferiore al 5 %), confermando, insieme ai risultati ottenuti dalle prove *in vitro* già descritte, la necessità di adoperare anche nelle semine in pieno campo seme sottoposto a vernalizzazione.

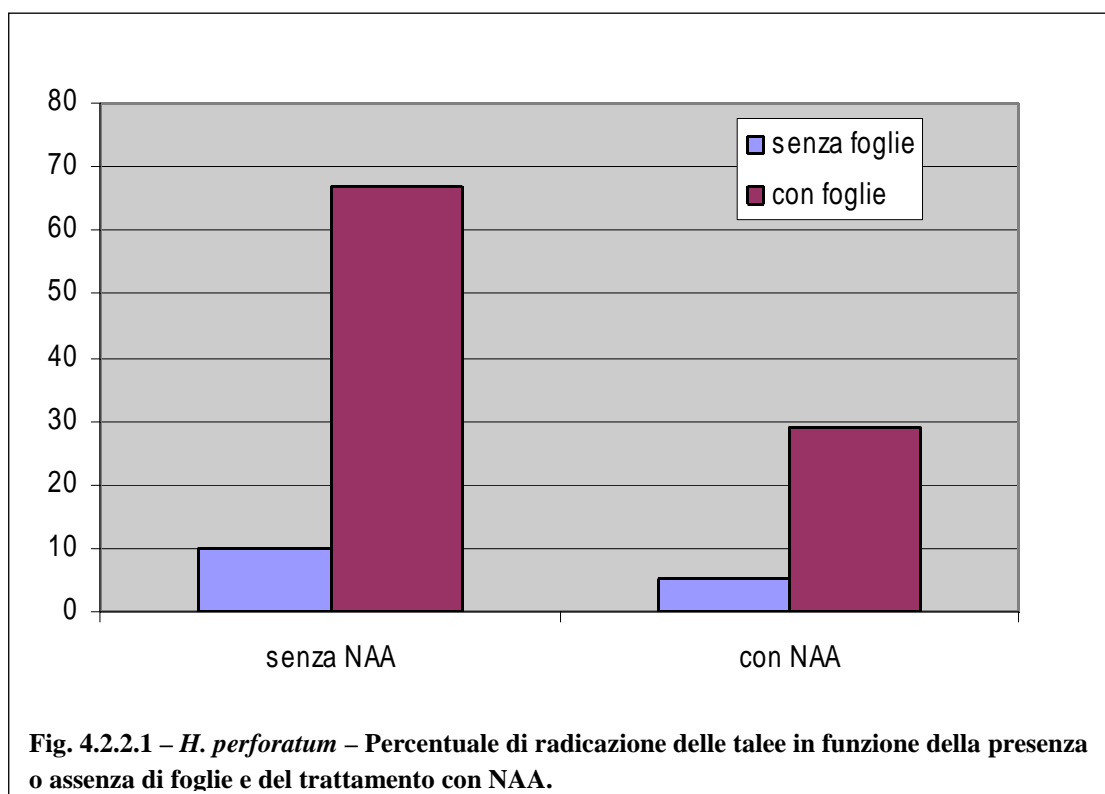
Le prime emergenze sono avvenute sempre dopo 7-10 giorni dalla semina, con un lieve ritardo nel caso delle semine autunnali. Le piante adulte sono state in seguito allevate in vasi con volume pari a 3 l, ad eccezione di quelle selezionate come piante madri che sono state collocate in contenitori di maggior volume (18 l).

La tabella riepilogativa 4.1.1.1 nel paragrafo “Raccolta e descrizione botanica” elenca le 31 accessioni provenienti da seme e poste in coltivazione.

4.2.2 Prove di propagazione agamica

- Taleaggio

I risultati della prova tendente a valutare l'effetto della presenza o meno delle foglie nelle talee sono illustrati in figura 4.2.2.1. Si evidenzia chiaramente che le talee di iperico con foglie hanno fatto registrare percentuali di radicazione più elevate (47,8 %) rispetto a quelle prive di foglie (7,5 %). La presenza dell'ormone radicante (NAA), inoltre, sembra



aver esercitato un complessivo effetto di inibizione dell'emissione di radici, in quanto le talee non trattate con NAA hanno fatto rilevare, mediamente, percentuali di radicazione più alte (38,3 %) rispetto a quelle trattate (16,4 %).

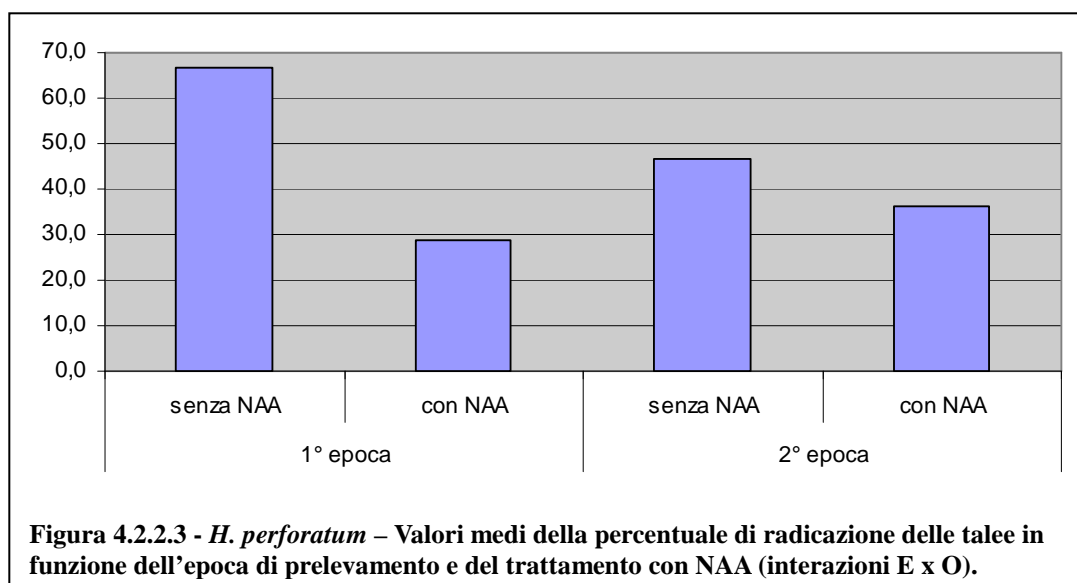
Nelle prove successive si è pertanto deciso di procedere impiegando solo talee provviste di

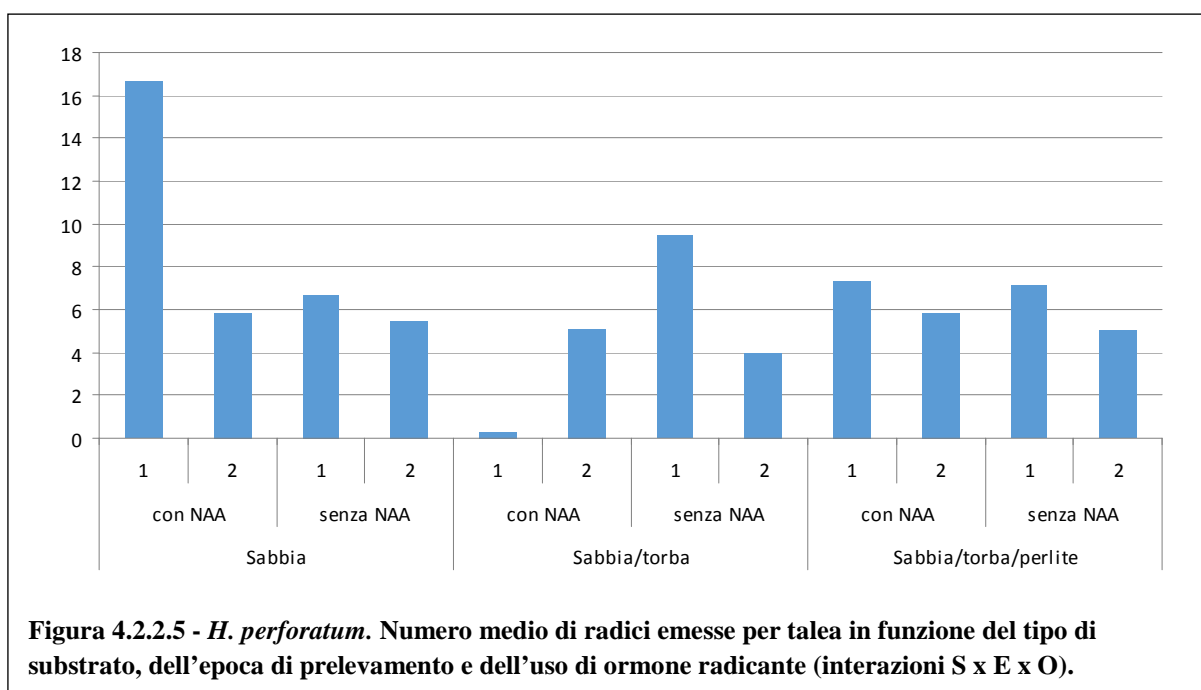
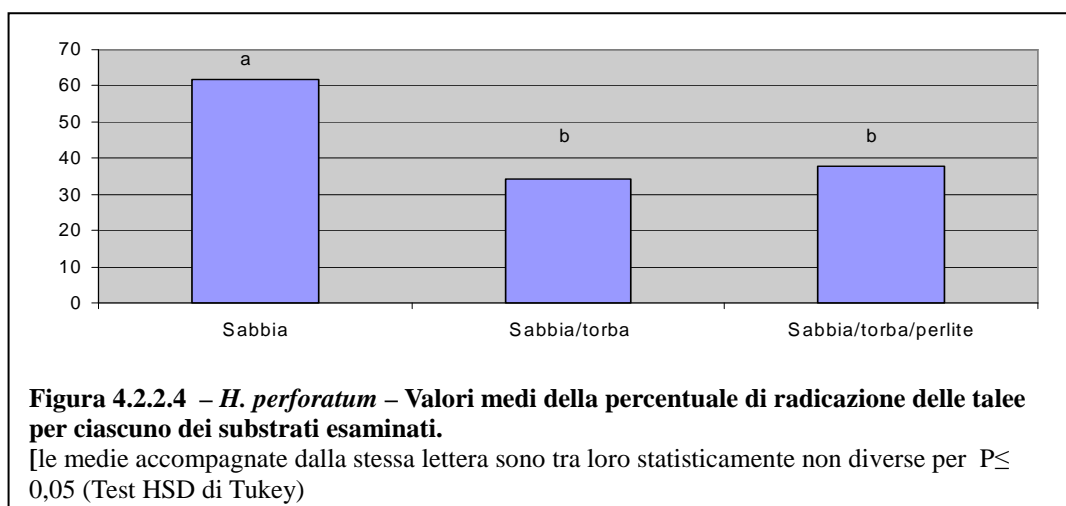
Tab. 4.2.2.2 - *H. perforatum* 2013 - Valori e significatività del rapporto di varianza F per la percentuale di radicazione delle talee, per il numero di radici per pianta e per la lunghezza media delle radici, in funzione dell'epoca del taleaggio (E), del substrato (S), della presenza di ormone radicante (O) e delle interazioni fra questi.

Fonte di variabilità	G L	% radicazione valori di <i>F</i>	N. radici/pianta valori di <i>F</i>	G L	Lunghezza media (cm) valori di <i>F</i>
Epoca (E)	1	1,28 ^{ns}	14,99 ***	1	29,70 ***
Substrato (S)	2	9,52 ***	10,63 ***	2	8,28 *
Ormone (O)	1	18,78 ***	≤ 1 ^{ns}	1	≤ 1 ^{ns}
S x E	2	1,95 ^{ns}	5,86 **	2	2,84 ^{ns}
S x O	2	1,50 ^{ns}	14,39 ***	2	2,60 ^{ns}
E x O	1	6,08 *	≤ 1 ^{ns}	1	≤ 1 ^{ns}
S x E x O	2	2,16 ^{ns}	16,79 ***	2	5,74 **
Errore	24			22	

[*** = $P \leq 0,001$; ** = $P \leq 0,01$; * = $P \leq 0,05$; ^{ns} = non significativo]

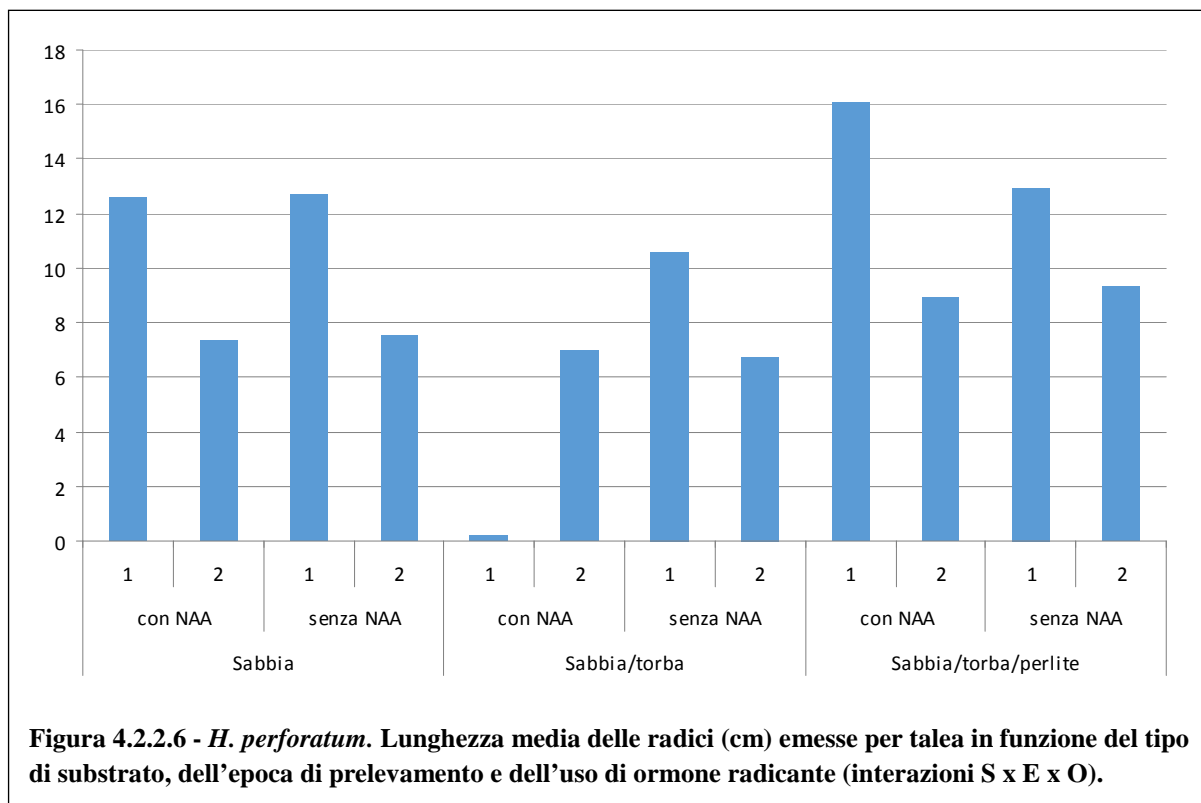
foglie; i risultati dell'ANOVA svolta relativamente al successo dell'operazione di taleaggio (numero, percentuale e lunghezza media delle radici emesse da ogni talea) vengono esposti in tabella 4.2.2.2, mentre i grafici nelle figure da 4.2.2.2 a 4.2.2.6 illustrano l'andamento medio dei parametri rilevati in funzione dei singoli fattori sperimentali.





L'ANOVA eseguita (tab. 4.2.2.2) ha evidenziato la diversa influenza esercitata dai fattori sperimentali. Dei tre parametri esaminati, la percentuale di radicazione è l'unico in cui l'analisi statistica non abbia messo in evidenza l'esistenza di interazioni statisticamente significative tra i fattori studiati (E, S ed O), che pertanto mostrano di esercitare un effetto esclusivamente additivo. Unica eccezione è l'interazione E x O (fig. 4.2.2.3), significativa per $P \leq 0,05$, in cui tuttavia l'osservazione dei dati mostra come l'effetto di interazione si esprima in un'accentuazione dell'effetto di riduzione della percentuale di radicazione dovuto all'uso dell'ormone radicante nella prima epoca di taleaggio rispetto alla seconda. In questo caso dunque la presenza di un'interazione statisticamente significativa non contraddice quanto mostrato dall'esame dei fattori singoli, ma lo amplifica. Il fenomeno si evidenzia soprattutto nel caso dell'epoca di taleaggio (47,8 % nella prima e 41,8 % nella

seconda), il cui effetto semplice risultava non significativo. L'esame degli effetti semplici evidenzia nettamente, inoltre, l'effetto negativo dell'uso di ormoni radicanti (56,7 % nelle tesi non trattate vs. 32,6% in quelle trattate).



I risultati relativi al tipo di substrato (tab. 4.2.2.2 e fig. 4.2.2.4) mostrano una percentuale di radicazione nettamente superiore su sabbia (61,7 %), ben distinta dagli altri due substrati che invece presentano valori statisticamente omogenei.

Per quanto riguarda il numero di radici emesso da ciascuna talea (tab. 4.2.2.2 e fig. 4.2.2.5) i risultati sono più eterogenei, come evidenziato dalla presenza di interazioni statisticamente significative tra tutte le variabili sperimentali. A parità di condizioni di epoca e substrato, la somministrazione di ormone radicante ha causato quasi invariabilmente una diminuzione del numero di radici per talea, ad eccezione della tesi su miscuglio di sabbia e torba, in cui tuttavia si era registrata la percentuale di radicazione in assoluto più bassa. Sempre sul miscuglio sabbia/torba, il vantaggio della prima epoca di taleggio rispetto alla seconda, pur sempre presente, si manifesta in misura molto più sfumata rispetto agli altri due substrati. Anche in presenza di notevoli oscillazioni dovute all'effetto delle altre variabili sperimentali, le migliori performance sono state comunque registrate nelle talee radicate su sabbia (8,6 radici/talea), seguite da quelle su sabbia/torba/perlite (6,6 radici/talea) e infine da quelle poste su sabbia/torba (4,7 radici/talea).

Per ciò che concerne infine la lunghezza media delle radici (tab. 4.2.2.2 e fig. 4.2.2.6), i migliori risultati sono stati forniti dalle talee radicate su sabbia/torba/perlite e su sola sabbia (11,8 e 10 cm, rispettivamente), permettendo di ipotizzare una positiva influenza su

Fonte di variazione	GL	Peso parte aerea (g)		Peso parte radicale (g)	
		fresco	secco	fresco	secco
SUBSTRATO (S)	2				
sabbia		1,87	0,44	1,86	0,52
sabbia/torba		1,76	0,38	1,10	0,31
sabbia/torba/perlite		3,69	0,75	2,98	0,78
<i>F</i> (2,12)		3,83 ^{ns}	3,60 ^{ns}	2,66 ^{ns}	1,94 ^{ns}
ORMONE (O)	1				
Con NAA		2,36	0,51	2,22	0,57
Senza NAA		2,52	0,53	1,75	0,51
<i>F</i> (1,12)		≤ 1 ^{ns}	≤ 1 ^{ns}	≤ 1 ^{ns}	≤ 1 ^{ns}
SUBSTRATO X ORMONE (S x O)	2				
sabbia	con NAA	1,66	0,39	1,95	0,48
	senza NAA	2,07	0,48	1,77	0,57
sabbia/torba	con NAA	1,73	0,39	0,93	0,29
	senza NAA	1,79	0,37	1,27	0,33
sabbia/torba/perlite	con NAA	3,67	0,76	3,77	0,94
	senza NAA	3,70	0,75	2,19	0,63
<i>F</i> (2,12)		≤ 1 ^{ns}	≤ 1 ^{ns}	≤ 1 ^{ns}	≤ 1 ^{ns}
Tabella 4.2.2.3 - <i>H. perforatum</i> 2013 - Valori e significatività del rapporto di varianza F per il peso fresco e secco all'aria della parte aerea e della frazione radicale, in funzione del tipo di substrato (S), della presenza di ormone radicante (O) e delle interazioni fra questi. [*** = P≤ 0,001 ; ** = P≤ 0,01 ; * = P≤ 0,05; ^{ns} = non significativo]					

questo parametro del livello di porosità del substrato.

La tabella 4.2.2.3 mostra i valori medi dei pesi, freschi e secchi, della parte aerea e della frazione radicale misurati nelle talee radicate poste sui tre substrati saggiati, raggruppati per ciascuno dei fattori semplici (substrato, S e ormone, O) e mediati per la loro interazione (S x O). La stessa tabella riporta anche i risultati dell'ANOVA eseguita per ognuna delle variabili esaminate, mostrando come nessuna di queste abbia causato variazioni statisticamente significative sui parametri studiati. Pur in assenza di una definitiva conferma statistica, è possibile notare come i pesi, sia freschi che secchi, in assoluto più elevati siano stati registrati sulle talee provenienti dal substrato

sabbia/torba/perlite, mentre le variazioni dovute all'uso dell'ormone radicante sono del tutto trascurabili.

- Micropropagazione

Per quanto riguarda le prove di propagazione *in vitro*, dalle osservazioni effettuate durante la fase di radicazione utilizzando substrati di crescita di Murashige e Skoog (MS) a diverso contenuto in macro e microelementi, con o senza l'aggiunta di ormoni radicanti (IAA e IBA), sembra che l'attitudine rizogena delle microtalee venga esaltata quando queste vengono poste su substrato base MS additivato con IBA.

4.2.3 Prove di adattabilità alle condizioni di pieno campo ed in vaso

In tabella 4.2.3.1 si riportano le osservazioni effettuate nel corso dei due anni di prova (2013-2014) riguardo all'individuazione della fase di piena fioritura, in ambedue le condizioni colturali. Si nota in primo luogo che nel 2013 le piante in vaso hanno presentato

Tabella 4.2.3.1 - <i>H. perforatum</i>. 2013 e 2014. Periodi di fioritura (settimana con piena fioritura) rilevati sulle accessioni in prova.				
provenienza geografica	In vaso		In piena terra	
	2013	2014	2013	2014
PFR- AG	IV maggio	I giugno	II giugno	I giugno
PFR- SI	I giugno	III giugno	III giugno	III giugno
PFR- TN	I giugno	II giugno	I luglio	IV giugno

Tabella 4.2.3.2 - <i>H. perforatum</i>. 2013 e 2014. Percentuale di fallanze rilevate nelle piante collocate in vaso e in piena terra			
provenienza geografica	In vaso	In piena terra	
PFR- AG	7,5 %	13,3 %	(30% nel 2014)
PFR- SI	8,0 %	10,0 %	(40% nel 2014)
PFR- TN	12,0 %	16,6 %	(64% nel 2014)

circa due settimane di anticipo rispetto a quelle collocate in terra, mentre nel 2014 le epoche si sovrappongono tra i due ambienti, eccezion fatta per l'accessione di TN (PFR-TN), in cui la fioritura nelle piante collocate in piena terra si è svolta circa due settimane dopo quelle in vaso. A parità di altre condizioni, le differenze tra i biotipi nord, centro e sud si possono riassumere in una scalarità del periodo di fioritura che, nell'ambiente meridionale in cui si è svolta la coltivazione, vede fiorire per primo il biotipo proveniente da sud, poi quello proveniente dal centro e per ultimo il biotipo nordico.

Il dato che probabilmente meglio sintetizza il livello di adattabilità dei tre genotipi alle condizioni di coltivazione è rappresentato dalla percentuale di fallanze rilevata, in ambedue le condizioni, rispetto al numero di individui originariamente messi a dimora (tab. 4.2.3.2). Nelle piante in piena terra, pur non registrando particolari patologie, al termine del primo anno si è rilevata una percentuale di fallanze oscillante tra il 10 e il 17 %; tra le cause del fenomeno, un ruolo cruciale spetta senz'altro alle condizioni di elevata temperatura e siccità del periodo estivo, a cui la provenienza settentrionale è stata visibilmente più sensibile. Il fenomeno è stato ancora più rilevante nel secondo anno, in cui la percentuale cumulata di fallanze ha raggiunto, nella stessa accessione, il 64%. Sulle piante poste in vaso, soggette a minori difficoltà di attecchimento e di sviluppo, è stata invece rilevata una massiccia infestazione da parte della cocciniglia degli agrumi (*Icerya purchasi*). I dati relativi alla lunghezza media degli steli ed al numero di steli fioriti per pianta, rilevati al momento della fioritura in tutte le condizioni sperimentali, sono riportati in tab. 4.2.3.3.

Tabella 4.2.3.3 - <i>H. perforatum</i>. 2013 e 2014. Lunghezza media steli e numero di steli fioriti per pianta, in vaso e in piena terra.								
provenienza geografica	2013				2014			
	Lunghezza media steli (cm)		N. steli fioriti per pianta		Lunghezza media steli (cm)		N. steli fioriti per pianta	
	vaso	piena terra	vaso	piena terra	vaso	piena terra	vaso	piena terra
PFR- AG	67,4	66,2	4,0	8,2	89,8	80,2	3,2	10,4
PFR- SI	29,4	28,7	7,8	11,6	46,2	34,1	4,5	18,0
PFR- TN	31,1	29,9	5,6	3,4	56,0	40,2	9,4	6,0

Al termine del primo anno di coltivazione, l'accessione siciliana si presentava caratterizzata dagli steli di lunghezza in assoluto maggiore, con valori più che doppi rispetto alle altre due, sia in pieno campo che in vaso. Al termine del secondo anno, tale differenziazione era ancora più marcata: la provenienza PFR-AG presentava steli di lunghezza superiore ad 80 cm in ambedue le condizioni colturali, mentre nelle accessioni PFR-SI e PFR-TN tale parametro si aggirava intorno ai 50 cm in vaso e ai 37 cm in piena terra. L'accrescimento degli steli da un anno all'altro ha mostrato in tutte le condizioni colturali valori piuttosto consistenti, in genere più elevati nelle accessioni in vaso e in quelle in cui il valore iniziale era più basso: nell'accessione PFR-AG 33,2 % e 21,2 %, nell'accessione PFR-SI 57,2 % e 18,7 % e nell'accessione PFR-TN 80,1% e 34,5 %, rispettivamente in vaso e in piena terra.

Le accessioni collocate in pieno campo si distinguono da quelle in vaso anche riguardo al

numero di steli fioriti per pianta (tab. 4.2.3.3), che al termine del primo anno mostra valori più elevati nella prima condizione rispetto alla seconda, tranne che per l'accessione PFR-TN che trova le condizioni migliori, relativamente a questo parametro, nella coltivazione in vaso. Il confronto tra i due anni mostra tuttavia una certa differenziazione tra le due tipologie di coltivazione, nel 2014 le accessioni PFR-AG e PFR-SI in vaso presentano una diminuzione del numero di steli fioriti pari al 20% nel primo caso e al 42% nel secondo, mentre l'accessione PFR-TN mostra un incremento del 67,8%. In piena terra invece l'andamento del parametro si presenta più lineare e costante, e in tutte e tre le accessioni si riscontra un incremento pari, rispettivamente, al 26,8%, (PFR-AG), al 55,2% (PFR-SI) e al 76,5% (PFR-TN).

La produzione ottenuta espressa in g di peso fresco e peso erboristico (secco all'aria) per pianta, viene riportata in tabella 4.2.3.4. La tabella mostra, in primo luogo, marcate

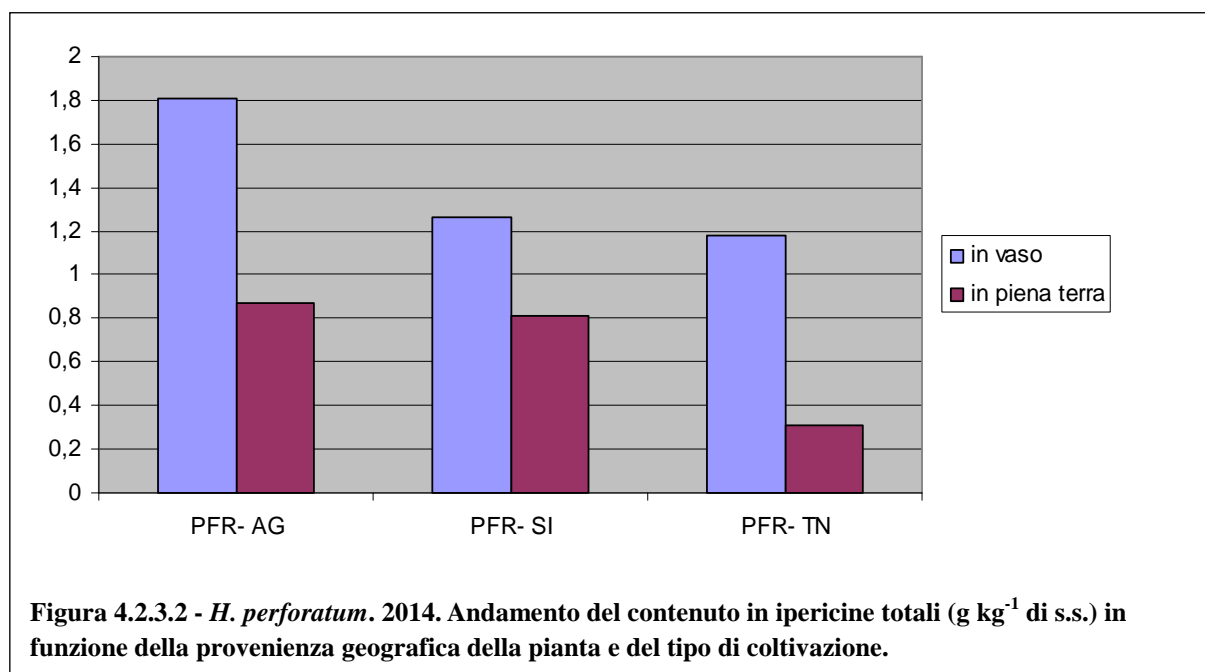
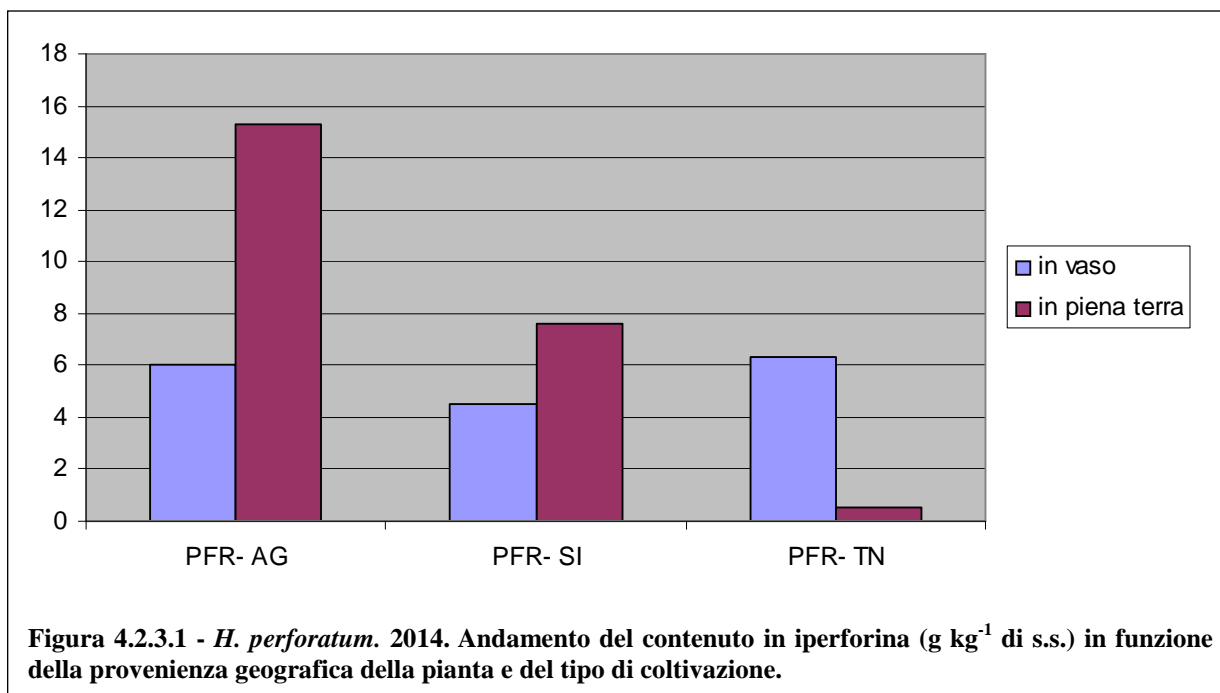
Tabella 4.2.3.4 - <i>H. perforatum</i>. 2013 e 2014. Principali parametri produttivi rilevati in piante collocate in vaso e in piena terra.								
provenienza geografica	2013				2014			
	Peso fresco parte aerea (g) per pianta		Peso erboristico parte aerea (g) per pianta		Peso fresco parte aerea (g) per pianta		Peso erboristico parte aerea (g) per pianta	
	vaso	piena terra	vaso	piena terra	vaso	piena terra	vaso	piena terra
PFR- AG	126,9	69,7	54,5	26,0	12,4	167,0	3,5	51,8
PFR- SI	32,6	45,7	15,2	15,4	4,0	132,5	0,9	46,4
PFR- TN	23,0	8,8	9,7	3,2	9,0	76,8	2,1	29,4

Tabella 4.2.3.5 - <i>H. perforatum</i>. 2014. Principali parametri qualitativi rilevati su piante collocate in vaso e in piena terra.								
provenienza geografica	Resa in estratto (%)		Iperforina (g kg ⁻¹ s.s.)		Pseudoipericina (g kg ⁻¹ s.s.)		Ipericina (g kg ⁻¹ s.s.)	
	vaso	piena terra	vaso	piena terra	vaso	piena terra	vaso	piena terra
PFR- AG	33,3	27,3	6,06	15,28	1,03	0,55	0,78	0,32
PFR- SI	25,0	24,9	4,51	7,57	0,93	0,58	0,33	0,23
PFR- TN	30,9	25,0	6,30	0,54	0,92	0,20	0,26	0,05

differenze tra il primo ed il secondo anno di produzione, sia pure con un andamento diverso secondo il genotipo e le condizioni di coltivazione. Nel primo anno, le accessioni in vaso hanno consentito produzioni per pianta più elevate di quelle in piena terra (fino a 3 volte nel biotipo PFR-TN); nel secondo anno invece le produzioni in vaso sono diminuite drasticamente, mentre quelle ricavate da piante in piena terra si sono stabilizzate (PFR-AG) o sono aumentate (fino a oltre sette volte nel biotipo PFR-TN).

La valutazione qualitativa (tab. 4.2.3.5) delle piante dei tre genotipi, ottenuti in ambedue le condizioni sperimentali, è stata effettuata determinando, per ciascuno dei prodotti ottenuti nel 2014, il valore dell'estratto secco (%) e il contenuto in ipericina, pseudoipericina e

iperforina (g kg^{-1} s.s.)



I valori più elevati della resa in estratto si sono in genere riscontrati nei campioni provenienti dalle colture in vaso e, tra le accessioni, nella PFR-AG, sia pure con un ridotto margine rispetto alle altre. La quantità di iperforina esprime valori complessivamente abbastanza omogenei tra i genotipi nelle piante in vaso (Figura 4.2.3.1), mentre quelle collocate in piena terra, pur trovandosi nelle medesime condizioni colturali e ambientali,

presentano valori estremamente variabili.

Le ipericine totali riscontrate nelle piante allevate in piena terra risultano essere in minore quantità rispetto a quelle prodotte in vaso, in particolare il biotipo PFR-TN. I valori delle ipericine totali, per tutti i campioni, sono ben al di sopra di quelli richiesti dalla Farmacopea Europea per l'impiego farmaceutico.

4.2.4 Prove di micorrizzazione

Nella tabella 4.2.4.1 sono mostrati i risultati relativi all'effetto della disponibilità di fosforo e dell'inoculo del suolo con funghi arbuscolo micorrizici (AM) sulla crescita dell'iperico (*Hypericum perforatum*, genotipo PFR-AG).

Tabella 4.2.4.1 - Effetti dell'inoculo con funghi arbuscolo micorrizici (AM) e della disponibilità di fosforo (P) sull'accrescimento della parte aerea e radicale in *Hypericum perforatum* (genotipo PFR-AG).

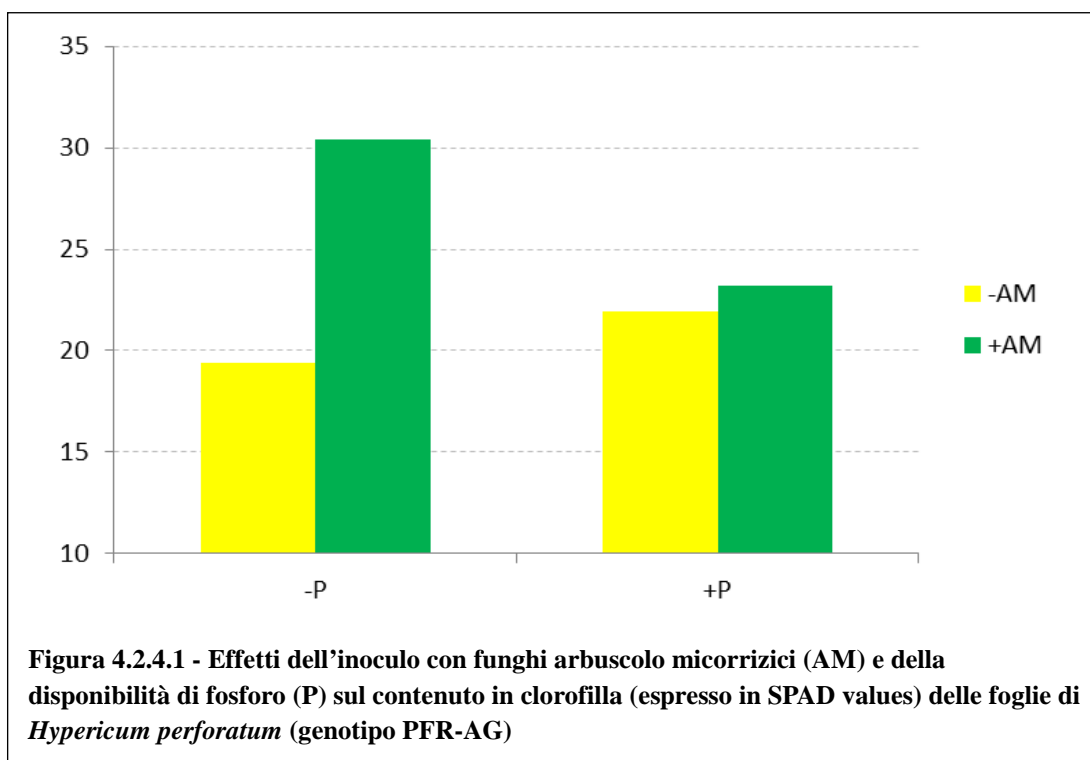
		Peso secco (g)			Contenuto% in sostanza secca		
		Totale	Epigeico	Radici	Totale	Epigeico	Radici
-P	-AM	62.9	21.4	41.5	33.7	35.3	33.0
	+AM	79.2	26.9	52.3	37.0	41.0	35.2
+P	-AM	69.3	24.1	45.2	37.3	35.5	38.3
	+AM	77.5	22.2	55.3	39.0	38.3	39.3

In generale, l'effetto della disponibilità fosforica sulla biomassa complessiva è stato modesto e ha comportato un incremento nella quantità di biomassa totale del 3.3%. L'inoculo con funghi AM ha invece comportato un notevole incremento della produzione (+18,5% rispetto alla tesi non micorrizzata), soprattutto quella di biomassa radicale. Il contributo dell'inoculo con funghi AM è inoltre stato più evidente nelle tesi non fertilizzate (+25,9% rispetto alla tesi non micorrizzata) che in quelle fertilizzate (+11,8% rispetto alla tesi non micorrizzata).

Tale risultato è dipeso probabilmente dall'effetto esercitato dai funghi AM nei confronti dell'attività fotosintetica. Infatti, nelle tesi non fertilizzate, l'inoculo con funghi AM ha incrementato i valori del contenuto in clorofilla (SPAD) del 56.7% (figura 4.2.4.1). Tale risultato è in accordo con Wright *et al* (1998a e 1998b) che hanno mostrato che i funghi AM sono capaci di stimolare l'attività fotosintetica al punto da ripagare ampiamente le loro esigenze in carbonio.

Il beneficio dei funghi AM sulla concentrazione in clorofilla non è tuttavia stato rilevato nelle tesi fertilizzate, il cui valore medio di SPAD è apparso simile alla tesi non fertilizzata e non inoculata. Ciò lascia supporre che la disponibilità di fosforo abbia ridotto l'attività

dei funghi AM, i quali hanno fornito alla coltura un beneficio evidente solamente nelle tesi non fertilizzate. Risultati analoghi sono stati trovati da diversi autori (Mohammad *et al*, 2004, Gao *et al*, 2010, Hammer *et al*, 2011, Teng *et al*, 2013). A conferma di ciò, è stato possibile osservare che l'inoculo con funghi AM ha notevolmente ridotto il numero di steli fioriti nella tesi fertilizzata, ma non in quella non fertilizzata (tabella 4.2.4.2).



La presenza di funghi AM nel mezzo di coltura ha determinato un incremento dell'attività vegetativa con ripercussioni negative su quella riproduttiva. Infatti, indipendentemente dalla fertilizzazione fosfatica, nelle tesi micorrizzate è stato osservato un numero di fiori del 48,7 % più basso rispetto alle tesi micorrizzate. Tale differenza è apparsa in relazione più ad un effetto dei funghi AM sul numero di fiori per stelo che sul numero di steli fioriti (tabella 4.2.4.2).

Tabella 4.2.4.2 - Effetti dell'inoculo con funghi arbuscolo micorrizici (AM) e della disponibilità di fosforo (P) sull'accrescimento degli steli e sui principali parametri della fioritura in <i>Hypericum perforatum</i> (genotipo PFR-AG).					
		N. steli fioriti/pianta	N. fiori/pianta	N. fiori/stelo	Lungh. media stelo non fiorito (cm)
-P	-AM	5.7	278.3	54.2	64.9
	+AM	6.7	136.3	20.7	60.9
+P	-AM	6.7	241.3	39.8	55.0
	+AM	4.3	130.0	33.3	57.7

Ciò può essere dipeso da diversi fattori, tra cui l'effetto dei funghi AM sul maggior assorbimento di nutrienti e tolleranza agli stress (Augé 2001, Smith e Read, 2008) che

possono a loro volta aver influito negativamente sulla fioritura, come anche osservato in altre sperimentazioni (Jeuffroy e Sebillotte, 1997, Perner *et al* 2007, Saia *et al* 2014).

Gli effetti dei nutrienti e dei funghi AM sul contenuto in metaboliti secondari (sia oli essenziali, sia composti polari) delle specie aromatiche e medicinali sono ancora oggetto di discussione. Se da un canto sembra che i funghi AM abbiano un ruolo importante nella sintesi dei composti secondari (Zeng *et al* 2013), dall'altro, numerosi lavori indicano come tale effetto vari ampiamente in funzione del fungo utilizzato e della disponibilità di nutrienti (Gupta *et al* 2002, Kapoor *et al* 2004, Coppetta *et al* 2007, Chaudhary *et al* 2008; Hofland-Zijlstra e Berendse, 2009, Geneva *et al*, 2010, Arango *et al* 2012, Zubek *et al* 2012, Lingua *et al* 2013).

I risultati ottenuti (tabella 4.2.4.3) mostrano che l'effetto della micorrizzazione sulla resa in composti secondari, analogamente a quanto osservato per gli SPAD values, si è manifestato con evidenza nelle tesi non fertilizzate, ma non in quelle fertilizzate. Indipendentemente dalla fertilizzazione fosfatica, la concentrazione di ipericina e pseudoipericina ha raggiunto valori più elevati nelle tesi micorrizzate, mentre la concentrazione in iperforina è apparsa inferiore.

Tabella 4.2.4.3 - Effetti dell'inoculo con funghi arbuscolo micorrizici (AM) e della disponibilità di fosforo (P) sulla resa in estratto etanolo e sui principali parametri qualitativi in <i>Hypericum perforatum</i> (genotipo PFR-AG).					
		Resa in estratto (%)	Iperforina (mg kg⁻¹)	Pseudoipericina (mg kg⁻¹)	Ipericina (mg kg⁻¹)
-P	-AM	15.2	2790	71	107
	+AM	23.4	2410	189	399
+P	-AM	17.0	2310	234	436
	+AM	17.7	1840	195	400

4.2.5 Studi sull'influenza del fotoperiodo sulla fioritura

Le piante collocate negli armadi termostatici, sottoposte a condizioni di illuminazione ininterrotta, hanno avviato la fioritura nel gennaio 2013, cioè dopo solo due mesi dall'avvio della prova, raggiungendo l'apice della fase intorno alla terza settimana di febbraio; le piante coltivate in condizioni di fotoperiodo naturale invece hanno raggiunto la stessa fase nella prima settimana di giugno, cioè ad oltre tre mesi di distanza dalle precedenti (tab. 4.2.5.1).

Le capsule prodotte dalle piante coltivate in armadio termostatico sono state prelevate ed esaminate dopo due mesi (fine aprile), periodo considerato ottimale per la piena maturazione del seme; alla loro apertura, tuttavia, i semi contenuti evidenziavano

colorazione chiara e assenza di embrione vitale, a conferma del marcato effetto depressivo esercitato dall'illuminazione continua sul decorso della fioritura.

Tabella 4.2.5.1 – <i>Hypericum perforatum</i> 2013. Periodi di massima fioritura in piante sottoposte a diverse condizioni di coltivazione (genotipo PFR-AG).	
Trattamento	Periodo di fioritura
Fotoperiodo naturale	I settimana giugno
Illuminazione ininterrotta	III settimana febbraio

L'analisi chimica eseguita sui fiori, i cui risultati vengono riportati in tabella 4.2.5.2, mostra per tutti e tre i principi attivi una forte diminuzione delle rese (quasi il 40% nelle ipericine totali e circa il 70% nell'iperforina) nelle piante sottoposte a illuminazione continua.

Tabella 4.2.5.2 - Effetti della coltivazione in condizioni diverse sulla resa in estratto etanolic e sui principali parametri qualitativi in <i>Hypericum perforatum</i> (genotipo PFR-AG) 2013.				
Trattamento	Resa in estratto (%)	Iperforina (mg kg⁻¹ s.s.)	Pseudoipericina (mg kg⁻¹ s.s.)	Ipericina (mg kg⁻¹ s.s.)
Fotoperiodo naturale	19,8	12680	510	400
Illuminazione ininterrotta	13,8	3680	272	251

Il risultato può in parte venire spiegato dal periodo complessivamente più breve che le piante collocate in armadio termostato hanno avuto a disposizione per elaborare ed immagazzinare metaboliti secondari.

Sembra possibile confermare, dunque, che come ipotizzato da Chen *et al* (2010), *H. perforatum* sia una specie longidiurna, con induzione della fioritura determinata da condizioni di illuminazione prolungata. In prospettiva, assume notevole interesse la verifica della possibilità di indurre artificialmente la fioritura interrompendo l'illuminazione continua mediante l'introduzione di brevi periodi di buio, per ottenere anticipi di raccolta di grande utilità pratica in coltura protetta.

4.2.6 Studi preliminari di resistenza/tolleranza allo stress salino

La prova ha mostrato come l'iperico sia dotato di scarsissima resistenza alla salinità, e come l'inoculo con micorrize amplifichi in qualche modo questa azione negativa. Dopo 60 giorni dall'inizio dell'esperimento, il numero delle piante sopravvissute nella tesi sottoposta al livello di salinità massimo (tesi B, 100 µM di NaCl) si era ridotto di oltre il 50

% e, sempre nella stessa tesi, la fioritura è stata totalmente inibita. I valori di SPAD (Soil Plant Analysis Development) misurati all'inizio e alla fine della prova (tab. 4.2.6.1) mostrano come le piante siano andate incontro nel corso della prova ad una marcata riduzione dell'attività fotosintetica, probabilmente legata ad un processo di senescenza fisiologico pressoché indipendente dalla salinità del mezzo.

Tabella 4.2.6.1 - Effetti del trattamento con soluzione di NaCl a concentrazioni crescenti, con e senza inoculo con funghi arbuscolo micorrizici (AM), sull'attività fotosintetica (valori di SPAD) di *Hypericum perforatum* (genotipo PFR-AG). Medie dei rilievi effettuati su 12 piante \pm deviazione standard.

Trattamento	Momento del rilievo (gg dall'inizio della prova)	Inoculo con AM	SPAD
C	0 (inizio prova)	M	37,88 \pm 3,44
		N	37,74 \pm 2,13
Media C (iniziale)			37,81 \pm 2,79
A	60 (fine prova)	M	28,35 \pm 4,35
		N	29,10 \pm 9,00
Media A			28,73 \pm 4,09
B	60 (fine prova)	M	0,0 \pm 0,0
		N	30,10 \pm 4,20
Media B			30,10 \pm 4,20
C	60 (fine prova)	M	26,80 \pm 1,30
		N	30,80 \pm 2,40
Media C (finale)			28,80 \pm 1,60
Media M	60 (fine prova)	M	30,00 \pm 5,94
Media N		N	27,58 \pm 2,66

Legenda - C: controllo (acqua non salinizzata); A: 50 μ M di NaCl; B: 100 μ M di NaCl.
M: tesi micorrizzata; N: tesi non micorrizzata.

L'inoculo con funghi AM, sia pure in presenza di una marcata variabilità entro trattamenti, sembra aver causato una complessiva diminuzione dei valori di SPAD rilevati, i cui valori medi a fine prova si presentavano invariabilmente più elevati nelle tesi non micorrizzate, inclusi i controlli non trattati.

La tabella 4.2.6.2 mostra, limitatamente alle tesi in cui la fioritura è stata registrata, l'andamento dei valori del numero e del peso fresco dei fiori per pianta al variare della salinità del mezzo ed in presenza o assenza di inoculo con funghi AM. I dati confermano la generale elevata sensibilità dell'iperico alla presenza di salinità, mostrando livelli produttivi nel controllo non trattato nettamente superiori a quelli riscontrati nella tesi A. Sul dato medio relativo alle tesi micorrizzate, che presenta valori di ambedue i parametri marcatamente superiori a quelli delle tesi non micorrizzate, influisce l'elevata produttività

raggiunta dal controllo micorrizzato (tesi C: 235,75 fiori per pianta, con un peso fresco superiore ai 4 g, vs 41 fiori per pianta e 0,53 g nelle corrispondenti tesi non micorrizzate).

Tabella 4.2.6.2 - Effetti del trattamento con soluzione di NaCl a concentrazioni crescenti, con e senza inoculo con funghi arbuscolo micorrizici (AM), sul numero di fiori per pianta e sul loro peso fresco (g) in <i>Hypericum perforatum</i> (genotipo PFR-AG). Medie dei rilievi effettuati su 12 piante \pm deviazione standard			
Trattamento	Inoculo con AM	N. fiori per pianta	Peso fresco fiori per pianta (g)
A	M	53,50 \pm 24,98	1,03 \pm 0,51
	N	59,00 \pm 22,85	0,96 \pm 0,38
Media A		56,80 \pm 40,94	0,99 \pm 0,74
B	M	0,00	0,00
	N	0,00	0,00
Media B		0,00	0,00
C	M	235,75 \pm 77,81	4,11 \pm 0,98
	N	41,00 \pm 11,00	0,53 \pm 0,10
Media C		196,8 \pm 104,46	3,40 \pm 2,22
Media M		175,00 \pm 109,26	3,08 \pm 2,18
Media N		54,50 \pm 36,96	0,85 \pm 0,63
Legenda - C: controllo (acqua non salinizzata); A: 50 μ M di NaCl; B: 100 μ M di NaCl. M: tesi micorrizzata; N: tesi non micorrizzata.			

La tabella 4.2.6.3 mostra le variazioni nella produzione di biomassa secca, sia radicale che aerea legate ai fattori sperimentali in esame. Lo stress salino ha determinato una marcata riduzione dell'accrescimento delle piante, che si è manifestata in misura proporzionale all'incremento della salinità, generando quindi effetti più vistosi nelle tesi a maggior concentrazione salina. L'effetto risulta ben evidente in ambedue le frazioni di biomassa rilevate, ma sembra aver determinato esiti più vistosi a carico delle radici, in cui la riduzione della biomassa secca per pianta rispetto al controllo raggiunge il 64,5 % e l'81,5 % rispettivamente per i due livelli di salinità sperimentati.

La tabella mostra inoltre il complessivo vantaggio indotto dall'assenza di micorrize sull'accrescimento della parte aerea delle piante, vantaggio presente in tutti i trattamenti ma particolarmente evidente nel controllo non salinizzato. Sembra possibile ipotizzare che la simbiosi comporti un consumo delle sostanze di riserva da parte delle piante che, soprattutto in condizioni di stress, induce un minor sviluppo degli apparati vegetativi. In assenza di stress (controllo C), la presenza delle micorrize sembra invece esercitare un leggero effetto stimolante nei confronti dell'accrescimento radicale, apparentemente favorendo una dislocazione preferenziale delle sostanze nutritive verso la frazione ipogea a scapito di quella epigea. Viene in parte confermata l'ipotesi di Zubek *et al* (2012), che

affermano che la presenza di micorrize fornisce vantaggi solo nella produzione di metaboliti secondari e non di biomassa.

Tabella 4.2.6.3 - Effetti del trattamento con soluzione di NaCl a concentrazioni crescenti, con e senza inoculo con funghi arbuscolo micorrizici (AM), sul peso secco (g) delle frazioni aerea e radicale per pianta in *Hypericum perforatum* (genotipo PFR-AG). Medie dei rilievi effettuati su 12 piante \pm deviazione standard.

Deviazione standard				
Trattamento	Momento del rilievo (gg dall'inizio della prova)	Inoculo con AM	Peso secco (g)	
			Radici	Epigeico
C	0 (inizio prova)	M	0,46 ± 0,14	0,59 ± 0,23
		N	0,30 ± 0,09	0,60 ± 0,33
Media C (iniziale)			0,38 ± 0,14	0,59 ± 0,28
A	60 (fine prova)	M	2,18 ± 0,13	1,65 ± 0,07
		N	4,16 ± 1,47	3,23 ± 0,39
Media A			3,17 ± 1,44	2,44 ± 0,84
B	60 (fine prova)	M	1,41 ± 0,44	1,06 ± 0,26
		N	1,89 ± 1,19	1,74 ± 0,30
Media B			1,65 ± 0,93	1,40 ± 0,44
C	60 (fine prova)	M	7,04 ± 0,62	5,81 ± 0,15
		N	10,82 ± 3,23	3,79 ± 0,82
Media C (finale)			8,93 ± 2,99	4,80 ± 1,17
Media M			3,54 ± 2,53	2,84 ± 2,12
Media N			5,62 ± 4,36	2,92 ± 1,03
Legenda - C: controllo (acqua non salinizzata); A: 50 µM di NaCl NaCl; B: 100 µM di NaCl. M: tesi micorrizzata; N: tesi non micorrizzata.				

4.2.7 - Potenzialità di utilizzo in ambito florovivaistico

Le specie (*H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. patulum* e *H. pubescens*) monitorate per il loro adattamento al clima locale hanno mostrato risposte comportamentali molto diverse. Di *H. androsaemum* sono state valutate 4 accessioni, ottenute da seme proveniente dalle province di Siena, Parma, Arezzo e Ancona e rispettivamente denominate AND-SI, AND-PR, AND-AR e AND-AN. Per i primi due anni le piante ottenute sono state coltivate in vaso all'aperto, procedendo al travaso in contenitori di dimensioni maggiori tra il primo e il secondo anno. Nel primo anno di vita hanno mostrato uno sviluppo regolare, mentre nel secondo anno, all'inizio dell'estate hanno mostrato segni di sofferenza, molto evidenti verso agosto (cambiamento nel colore e nello spessore delle foglie, a volte bruciate ai margini) e sono state ricollocate in zona a mezza ombra. Di tutte le accessioni l'unica ad avere fiorito, alla fine di maggio del secondo anno, è stata AND-PR che ha portato a maturazione le bacche con semi.

In vaso l'habitus dei 4 biotipi può essere descritto come assurgente per AND-SI e AND-PR e ricadente per AND-AN e AND-AR. Le 3 accessioni di cui si possedevano più individui sono state collocate in piena terra a fine giugno.

L'attecchimento è stato migliore per AND-AR e AND-AN, più difficoltoso per AND-PR (rispettivamente 95 %, 78 % e 62 %). L'accrescimento è proseguito in modo regolare fino a novembre. Nei mesi invernali la stasi vegetativa è avvenuta senza perdita di foglie.

Di *H. calycinum* sono state poste in coltivazione 2 accessioni (CLC 1 da Palermo e CLC 2 da Arezzo), propagate per talea. Nel secondo anno di vita in vaso entrambe hanno manifestato forti sintomi di sofferenza, e tra queste solo la CLC 2 è fiorita all'inizio di giugno, con formazione di capsule che tuttavia sono risultate vuote. Gli individui messi a dimora all'inizio di luglio hanno presentato un attecchimento del 67 %. L'accrescimento è apparso piuttosto contenuto e il viraggio al rosso delle foglie sembra esprimere una certa difficoltà di adattamento.

La specie *H. patulum* (1 accessione) proviene da 4 talee prelevate in provincia di Arezzo, collocate in vaso all'inizio di aprile 2013 e su cui non è stata rilevata fioritura. La maggioranza delle piante ottenute è stata collocata a terra, all'inizio di ottobre. Sono tutte attecchite e appaiono in perfetto stato.

H. pubescens, di cui si vuole valutare anche la predisposizione all'utilizzo come specie coprisuolo, ha un accrescimento strisciante e tende ad allargarsi a raggiera, a partire da una



Impianto di specie ornamentali di Iperico (*H. androseum*, *H. calycinum*, *H. patulum* e *H. pubescens*) su terrazzamento

rosetta centrale. In vaso, dove ha vegetato per 2 anni ed ha fiorito, l'habitus che la caratterizza la porta ad un sviluppo centrifugo, che trova miglior espressione a terra. La fioritura, in vaso, è cominciata all'inizio di maggio ed è proseguita fino all'inizio di settembre (4 mesi).

Tutte le specie, quando collocate in vaso, hanno subito attacchi da parte di *Icerya purchasi*, ma la specie più sensibile, ad una stima visiva, è apparsa essere *H. calycinum*.

5. CONCLUSIONI

“È necessario avere una visione d'insieme che prenda in considerazione gli aspetti biologici, chimici, genetici e agronomici dei “sistemi vegetali”, se si vuole ottenere un reale sviluppo nella coltivazione delle piante officinali” (Saxena *et al* 2007).

Il lavoro svolto nel corso del triennio di dottorato ha avuto l'obiettivo di fornire indicazioni di base e sviluppare metodiche operative per definire le strategie di conservazione del genere *Hypericum* nella flora spontanea siciliana, nell'ipotesi di poterne ottenere una ampia valorizzazione agronomica.

Sono state acquisite nuove e utili informazioni riguardo alla localizzazione di popolazioni di *Hypericum* presenti in Sicilia appartenenti a 7 specie sulle 10 segnalate in totale, per alcune delle quali le segnalazioni si basavano su avvistamenti risalenti all'inizio del XIX secolo. La raccolta dei semi o di altre parti vegetative ha consentito la realizzazione di una consistente collezione di semi e piante, comprendente 11 delle 26 specie di *Hypericum* presenti in Italia, e la loro coltivazione *ex-situ*, permettendo di seguirne nel dettaglio il comportamento ontogenetico nelle condizioni di coltivazione tipiche delle aree mediterranee. Le descrizioni fenologiche presenti in bibliografia, riferite genericamente a tutta la penisola italiana, hanno mostrato di adattarsi in maniera molto limitata alle aree meridionali, e in alcuni casi (ad es. *H. pubescens*) sono state messe in luce ad esempio importanti variazioni nell'epoca di fioritura.

L'applicazione all'iperico della tecnica di DNA-barcoding ha avuto effetti positivi e peculiari sull'identificazione a livello di specie, fissandone in modo certo l'identità, mentre più limitata è risultata l'utilità ai fini dell'identificazione dei taxa di rango inferiore.

La raccolta delle sommità fiorite ha permesso di effettuare analisi qualitative e quantitative dell'estratto ottenuto dalle diverse specie, alcune delle quali ancora poco studiate (*H.*

pubescens, *H. hircinum*, *H. androsaemum*, *H. perfoliatum*), consentendo un reale confronto tra specie e biotipi di diversa provenienza, in alcuni casi collocati nel medesimo ambiente di crescita.

L'analisi chimica degli estratti di differenti popolazioni di *H. perforatum* e *H. perfoliatum* ha reso evidente l'ampia variabilità intraspecifica ed interspecifica della composizione chimica, anche in relazione all'ambiente di coltivazione e di accrescimento. Le piante coltivate in condizioni di fotoperiodo forzato, pur anticipando di quasi tre mesi il momento della fioritura, hanno mostrato una forte diminuzione delle rese di tutti e tre i principi attivi (quasi il 40% nelle ipericine totali e circa il 70% nell'iperforina).

Molti dei biotipi siciliani sono risultati particolarmente ricchi in metaboliti secondari, e in generale le prove agronomiche condotte sembrano convergere verso la conclusione che la coltivazione dei genotipi locali consenta risultati produttivi complessivamente migliori, anche con input agronomici ridotti.

Gli studi svolti *in vitro* sulla moltiplicazione gamica hanno confermato l'importanza della vernalizzazione dei semi ai fini di una buona risposta germinativa, e della mancata influenza dei PGPR (*P. fluorescens*) sulla germinazione.

Le prove di propagazione agamica hanno ottenuto ottimi risultati sia riguardo alla tecnica di taleaggio, con l'individuazione dei substrati più opportuni, che in quella di micropropagazione, con una più precisa definizione dei processi di radicazione e acclimatamento delle plantule. È emerso che la tecnica propagativa deve essere definita in base agli obiettivi attesi della produzione, di volta in volta riguardanti la produzione di biomassa o la coltivazione di genotipi particolarmente indicati per specifiche finalità terapeutiche. Ai fini di una produzione massiva di droga grezza saranno preferibili colture derivanti da seme, in cui la presenza di un'ampia variabilità genetica può dar luogo mediamente a produzioni quantitativamente più stabili. Nel secondo caso, per selezionare biotipi più ricchi in principi attivi specifici (ipericine, iperforina o altri metaboliti secondari), le piante coltivate dovranno preferibilmente avere origine agamica, così da conservare le peculiarità positive proprie delle piante madri. Tali considerazioni sono altrettanto valide nel caso di accessioni utili individuate a scopi ornamentali.

In *H. perforatum*, un confronto quanti-qualitativo tra tre biotipi diversi per origine geografica, posti nelle medesime condizioni di sviluppo, ha evidenziato l'eccellente attitudine produttiva, sia in vaso che in pieno campo, dell'accessione siciliana, che si è distinta sia per produzione di biomassa che per concentrazione di principi attivi. Considerazioni a parte vanno fatte sulle agrotecniche innovative applicate sempre su *H.*

perforatum (micorrizzazione, uso di ormoni radicanti) che hanno fornito indicazioni interessanti. Né l'inoculo con funghi micorrizici, né i trattamenti ormonali alle talee, hanno dato luogo a risultati incoraggianti sul piano produttivo: la presenza di funghi AM ha determinato un incremento dell'attività vegetativa con ripercussioni negative su quella riproduttiva, mentre i trattamenti ormonali hanno mostrato una netta diminuzione della percentuale di radicazione delle talee. *H. perforatum* si conferma come una specie scarsamente domesticata, non in grado di rispondere positivamente a questi input tecnici. *H. perforatum* ha mostrato un ridotto livello di tolleranza/resistenza allo stress salino, anche in presenza di contemporaneo apporto micorrizico.

La prova di valutazione a fini florovivaistici ha consentito di identificare quattro specie (*H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. patulum*, *H. pubescens*) particolarmente promettenti a causa della loro elevata valenza estetica. Piuttosto ridotta, tuttavia, è stata la risposta delle specie selezionate alle condizioni di coltivazione in vaso, a cui tutte (soprattutto a partire dal secondo anno) sono sembrate adattarsi in misura piuttosto limitata, mentre senz'altro da preferire appare la loro coltivazione in piena terra.

L'iperico, nella sua molteplicità di specie e biotipi locali, si conferma dunque come una coltura potenzialmente assai interessante in vista della sua introduzione nei sistemi produttivi delle aree mediterranee, in cui potrebbe svolgere un ruolo importante ai fini della diversificazione del reddito aziendale. L'accentuata adattabilità alla coltivazione in pieno campo degli ecotipi locali, soprattutto con input tecnici ridotti, permette di ipotizzarne un ruolo importante nella pianificazione di strategie tendenti alla valorizzazione del germoplasma vegetale mediterraneo.

6. BIBLIOGRAFIA

ACTA PLANTARUM, www.actaplantarum.org [ultimo accesso: 13/01/2015]

Ayan K., Yanar O., Cirak C., Bilgener M. (2007). Morphogenetic and diurnal variation of total phenols in some *Hypericum species* from Turkey during their phenological cycles. Bangladesh J. Bot. 36 (1): 39-46.

Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nishiyama Y., Inaba M., Murata N. (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp.. Plant Physiol., 123: 1047–1056.

Almeida I.F., Fernandes E., Lima J.L.F.C., Cardoso Costa P., Bahia M.F. (2009) In vitro protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species journal compilation Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 105: 222–227.

Andersson L., Milberg P. (1998) Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. Seed Science Research, 8: 29–38.

Anyóewska M., Kowalczyka A., Lozaka A., Jablczyska R., Fijalek Z. (2010) Determination of total hypericins in St. John's wort, Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research, 67 (6): 587-593.

A.P.A.T. - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (2006) Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma, Manuali e Linee Guida 37.

A.P.G. III system THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161: 105–121.

Arango M., Ruscitti M., Ronco M.G., Beltrano J. (2012) Mycorrhizal fungi inoculation and phosphorus fertilizer on growth, essential oil production and nutrient uptake in peppermint (*Mentha piperita* L.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 14: 692–699.

Attard E., Pacioni P. (2011) The Phytochemical and *In Vitro* Pharmacological Testing of Maltese Medicinal Plants, in Bioactive compounds in phytomedicine, ed Rasoli I., Published by InTech-Croatia: 93-112.

Augé R.M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza, 11: 3–42.

Aziz N., Sauve R.J., Long D., Cherry M. (2006) Genetic and phytochemical diversity assessment among eleven *Hypericum* accessions via AFLP and HPLC analyses. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 12 (1-2): 97-105.

Baatour O., Nasri-Ayach M. B., Mahmoudi H., Tarchoun I., Nassri N., Zaghdoudi M., Abidi W., Kaddour R., M'rah S., Hamdaoui G., Marzouk B., Lachaâl M. (2012) Salt effect on physiological, biochemical and anatomical structures of two *Origanum majorana* varieties (Tunisian and Canadian). African Journal of Biotechnology, 11 (27): 7109-7118.

Baggio Savio L.E., Vieira Astarita L., Romanato Santarem E. (2012) Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. Plant Cell Tiss Organ Cult 108:465–472.

- Barcaccia G., Arzenton F., Sharbe T.F., Varotto S., Parrini P., Lucchin M. (2006) Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L.. *Heredity*, 96: 322–334.
- Baser K.H.C., Ozek T., Nuriddinov H.R., Demirci A.B. (2002) Essential oils of two *Hypericum* species from Uzbekistan *Chemistry of Natural Compounds*, 38, 1.
- Becker H. (2000) Boosting the quality and potency of St. John's wort. *Agric. Res.*, 48: 12-13.
- Beerhues L. (2011) Biosynthesis of the active *Hypericum perforatum* constituents. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5: 70-77.
- Bennett M.A., Evans A.F. (2002) Seed Dormancy Mechanisms in some Vegetable, Seeds: Trade, Production and Technology: 93-100.
- Berger-Büter K., Büter B. (2002) Ontogenic variation regarding hypericin and hyperforin levels in four accessions of *Hypericum perforatum* L. *J. Herbs, spices and Medicinal Plants*, 9: 95-100.
- Berti M., Hevia F., Wilckens R., Joublan J.P., Serri H., Allende J. (2000). Fertilización nitrogenada del cultivo de Hierba de san Juan (*Hypericum perforatum* L.) en Chillan, provincia de Ñuble, Chile. *Cien. Investig. Agr.*, 27 (2): 107-116.
- Bertoli A., Cyrak C., Teixeira da Silva J.A. (2011) *Hypericum* species as sources of valuable essential oils. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5 (I): 29-47.
- Bezzi A., Aiello N. (1998) Yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) Biological qualitative and productive aspects, *Agricoltura Ricerca.*, 20 (176): 8-17
- Bombardelli E., Morazzoni P. (1995) *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 66: 43-68.
- Borrelli F., Izzo A.A. (2009) Herb –Drug interactions with St John's Wort (*Hypericum perforatum*) an update on clinical observations. *The AAPS Journal*, 11 (4): 710-727.
- Böttcher H., Günther I., Kabelitz L. (2003) Physiological postharvest responses of common St.-John's wort herbs (*Hypericum perforatum* L.) *Postharvest Biology and Technology*, 29: 342- 350.
- Boubakir Z., Beuerle T., Liu B., Beerhues L. (2005) *Hypericum calycinum* biosintesis de hiperforina. *Phytochemistry*, 66: 51–57.
- Bretzel F. Pezzarossa B., Malorgio F., Carrai C. (2006) Specie erbacee spontanee (wildflowers) per la riqualificazione ambientale di suoli marginali. *Flortecnica*, 4: 2-8
- Brink M. (1999). *Hypericum* L. in: de Padua, L.S., Bunyaphatsara, N., Lemmens, R.H.M.J. (Editors). *Plant Resources of South-East Asia 12 (1): Medicinal and poisonous plants 1*. Backhuys Publisher, Leiden, The Netherlands: 303-307
- Briskin D.P., Gawienowski M.C. (2001) Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol. Biochem.*, 39 :1075–1081
- Bruni A., Nicoletti M., Bruni L. (2003) *Dizionario ragionato di erboristeria e di fitoterapia*, Ed. Piccin Nuova Libreria, Padova.
- Bruni R., Pellati F., Bellardi M.G., Benvenuti S., Paltrinieri S., Bertaccini A., Bianchi A. (2005) Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection, *J. Agric. Food. Chem.*, 53 (4): 964-968.

- Bruni R., Sacchetti G. (2009) Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown (*H. perforatum* L. *Hypericaceae/Guttiferae*). *Molecules*, 14: 682-725.
- Buckley Y.M., Briese D.T., Rees M. (2003) Demography and management of the invasive plant species *Hypericum perforatum* . II Construction and use of an individual-based model to predict population dynamics and the effects of management strategies. *Journal of Applied Ecology*, 40: 494–507.
- Butterweck V., Schmidt M. (2007) St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy, *Wiener Medizinische Wochenschrift- Springer*, 157/13-14: 356-361.
- Büter B., Orlacchio C., Soldati A., Berger K. (1998) Significance of Genetic and Environmental Aspects in the Field Cultivation of *Hypericum perforatum* Biochemistry, Physiology, in vitro Cultures. *Planta Med*, 64 (5): 431-437.
- Butola J.S., Pant S., Samant S.S. (2007) Effect of Pre-sowing Seed Treatments in *Hypericum perforatum* L: A High Value Medicinal Plant. *Seed Research*, 35 (2): 205-209.
- Kakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S., Hirata T. (2004) Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 62–68.
- Camas N., Caliskan O. (2011) Breaking of seed dormancy in *Hypericum leptophyllum* Hochst., an endemic Turkish species, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (32): 6968-6971.
- Camas N., Radusiene J., Ivanauskas L., Jakstas V., Cirak C. (2014) Altitudinal changes in the content of bioactive substances in *Hypericum orientale* and *Hypericum pallens*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (3): 675-686
- Campbell M.H. (1985) Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum* L. *Weed Research*, 25 (4): 259–266.
- Canter P.H., Thomas H., Ernst E. (2005) Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23 (4): 180-185.
- Carrubba A., Catalano C., Bontempo R. (2008) Cultivation of wild medicinal species: opportunities and constraints. *Proc. SILAE 2008. Palermo*, 16-20 settembre 2008: 120.
- Carrubba A., Catalano C. (2009) Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture - a review". In: Lichtfouse E., "Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms": 137-188, Dijon, Springer.
- Carrubba A., Catalano C., Militello M. (2010) Prove di coltivazione di iperico (*Hypericum perforatum* L.) in ambiente semi-arido. Atti 4° Convegno Nazionale Piante Mediterranee - "Le potenzialità del territorio e dell'ambiente": 209-213. A cura di G. Sarli, A. Alvino, C. Cervelli: 200-204.
- Castellano G., Spadaro V. (2010) *Hypericum calycinum* (Clusiaceae) in Sicilia: aspetti farmacognostici e corologici, *Quaderni di Botanica ambientale e applicata*, 21: 29-32.
- Celen G., Ozkan S., Ayhan F. (2008) The Phenolic Compounds from *Hypericum perforatum* and their Antimicrobial Activities. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 36 (4): 339-345.
- Chatterjee S.S., Bhattacharya S.K., Wonnemann M., Singer A., Müller W.E. (1998). Hyperforin as

a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. Life Sciences, 63 (6): 499-510.

Chaudhary V., Kapoor R., Bhatnagar A.K. (2008) Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. Applied Soil Ecology, 40: 174–181.

Chen S.S., Spiro M. (1994) Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials, Journal of microwave power and electromagnetic energy 9 (4): 231-241.

Chen C.L., Tsai Y.J., Sung J.M. (2010) Photoperiod effects on flowering and seed setting of *Hypericum perforatum*, Experimental Agriculture, 46 (3): 393-400.

Chia G (2005) L'iperico: l'antidepressivo naturale, Macroedizioni- Librisalus.

Chouard P. (1960) Vernalization and its Relations to Dormancy, Annual Review of Plant Physiology, 11: 191-238.

Ciccarelli D., Garbari F. (2004) Le unità italiane di *Hypericum* (Clusiaceae), serie *Hypericum*. (The Italian units of *Hypericum* (Clusiaceae), series *Hypericum*.) Inform. Bot. Ital., 36: 413-424.

Cirak C. (2007) Seed germination protocols for *ex situ* conservation of some *Hypericum* species from Turkey. American Journal of Plant Physiology, 2 (5): 287-294.

Cirak C., Radušienė J., Janulis V., Ivanauskas L., Arslan B. (2007) Chemical constituents of some *Hypericum* in Turchia. Journal of Plant Biology, 50 (6): 632-635.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C. (2005) An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Roma, Palombi Editore, 32: 3-97.

Crockett S.L. (2010) Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae), Nat. Prod. Commun, September; 5 (9): 1493-1506.

Crockett S.L. (2011) Analysis of the Volatile Constituents of Five African and Mediterranean *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hypericoideae) Species.

Crockett S.L., Demirci B., Başer K.H.C., Khan I.A. (2007). Analysis of the volatile constituents of five african and mediterranean *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hypericoideae) species. Journal of Essential Oil Research, 19 (4): 302-306.

Crockett S.L., Robson N.K.B. (2011) Taxonomy and Chemotaxonomy of genus *Hypericum*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 5 (I): 1-13.

Crockett S.L., Schaneberg B., Khan I.A. (2005) Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's wort) species. Phytochem. Anal., 16: 479-485.

De Clercq E. (2000) Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Medicinal research reviews, 20 (5): 323-349.

Delgado-Sánchez P., Ortega-Amaro M.A., Jiménez-Bremont J.F., Flores J. (2011) Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). Plant Biology, 13 (1): 154–159.

Demirci B., Başer K.H.C., Crockett S.L., Khan I.A. (2005) Analysis of the Volatile Constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hypericoideae) Species. Journal of Essential Oil Research, 17 (6): 659-663.

Dousset J.C. (1989) Storia dei medicinali e dei farmaci. Dalle origini ai giorni nostri. ECIG, Genova: 38-39.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

ECPGR (2004) Report of a working group on medicinal and aromatic plants, Second Meeting, 16–18 December 2004, Strumica, Macedonia FYR, Third Meeting, 26–28 June 2007, Olomouc, Czech Republic, E. Lipman Ed.: 242 pp.

Edwards C.E., Arakaki M., Quintana-Ascencio F., Soltis D.E., Soltis P.A. (2007) Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered highlands scrub *Hypericum* (*Hypericum cumicola*). *Molecular Ecology Notes*: 1135–1137.

E.M.E.A. European Medicines Agency (2009) Evaluation of medicines for human use, Committee on herbal products: 2-7.

Ertürk O., Sekeroglu V., Kalkan A.K.Y. (2004) Antifeedant and toxicity effects of some plant extracts on *Yponomeuta malinellus* Zell.. (LEP.: YPONOMEUTIDAE). *Journal of Plant Protection Research*, 44 (3): 165-174.

Esposito A.V., Vieira Pereira D.M., Machado Rocha L., Tavares Carvalho J.C., Maistro E.L. (2005) Evaluation of the genotoxic potential of the *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) extract in mammalian cell system in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, 28 (1): 152-155.

Evans C.E., Etherington J.R. (1990) The effect of soil water potential on seed germination of some British plants, 115 (3): 539–548.

Fazekas A.J., Burgess K.S., Kesanakurti P.R., Graham S.W., Newmaster S.G., Husband B.C., Percy D.M., Hajibabaei M., Barrett S.C.H. (2008) Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally. *PLoS ONE* 3(7): e2802.

Federici E., Multari G., Gallo F.R., Palazzino G. (2005) Le droghe vegetali: dall'uso tradizionale alla normativa, *Ann. Ist. Super. Sanità* 41(1):49-54

Ferretti G., Maggi F., Tirillini B. (2005) Essential oil composition of *Hypericum richeri* Vill. from Italy. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 295–298.

Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *NewPhytologist*, 171:501–523.

Flagella Z., Cantore V., Boari F., Volpe D., De Caro A., (2013) Tolleranza allo stress salino delle specie coltivate in relazione agli aspetti fisiologici, produttivi e qualitativi. www.ispa.cnr.it [ultimo accesso: 13/01/2015]

Foddìs C., Maxia A. (2006) Le piante utilizzate nella medicina popolare dell'Ogliastra (Sardegna Centro-Orientale) per la cura delle patologie del sistema muscolo-scheletrico. *Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari*, 76 (1-2)

Fox L.R., Ribeiro S.P., Brown V.K., Masters G.J., Clarke I.P. (1999) Direct and indirect effects of climate change on St John's wort, *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). *Oecologia*, 120: 113-122.

Franchi G.G., Nencini C., Collavoli E., Massarelli P. (2011) Composition and antioxidant activity in

vitro of different St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. Journal of Medicinal Plants Research, 5 (17): 4349-4353.

Fraternali D., Bertoli A., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Menichini F., Trinciarelli E., Pistelli L. (2006) Antifungal evaluation of *H. triquetrifolium* polar extracts against *Fusarium* spp.. Natural Product Communications, 1 (12): 11-19.

Galla G., Barcaccia G., Schallau A., Molins M.P., Baümlein H., Sharbel T.F. (2011) The cytohistological basis of apospory in *Hypericum perforatum* L.. Sex Plant Reprod, 24:47–61.

Gao X., Akhter F., Tenuta M., Flaten D.N., Gawalko E.J., Grant C. (2010) Mycorrhizal colonization and grain Cd concentration of field-grown durum wheat in response to tillage, preceding crop and phosphorus fertilization. Journal of the science of food and agriculture 90: 750–8.

Ghasemi Y., Khalaj A., Mohagheghzadeh A., Khosravi A.R. (2007) Composition and antimicrobial activity of OE of *Hypericum elongatum*. Journal of Applied Sciences, 7 (18): 2671-2675.

Gaudel M. (2006) Disjunct distribution of *Hypericum nummularium* L. (Hypericaceae): molecular data suggest bidirectional colonization from a single refugium rather than survival in distinct refugia. Biological Journal of the Linnean Society, 87: 437–447.

Geneva MP, Stancheva I V, Boychinova MM, Mincheva NH, Yonova PA. (2010) Effects of foliar fertilization and arbuscular mycorrhizal colonization on *Salvia officinalis* L. growth, antioxidant capacity, and essential oil composition. Journal of the science of food and agriculture, 90: 696–702.

Ghavamaldin A., Aptin R., Khalil P., Mansour G., Mariamalsadat T. (2012) Study of variation of biochemical components in *Hypericum perforatum* L. grown in North of Iran. Journal of Medicinal Plants Research, 6 (3): 366-372.

Gianguzzi L., D'Amico A., Caldarella O., Romano S. (2011) Naturalista sicil., S. IV, XXXV (3-4): 363-405.

Giardina G., Raimondo F. M., Spadaro V. (2007) A catalogue of plants growing in Sicily. Boccone, 20: 5-582.

Giardina G. (2010) Piante rare della Sicilia, Palermo, Università degli studi di Palermo, vol. unico: 60-62.

Glick B.R., Jacobson B.B., Schwarze M.M.K., Pasternak J.J. (1994) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Canadian Journal of Microbiology, 40 (11): 911-915.

Gonzalez-Martin M. (1995) Germinacion y requerimientos de luz de especies del genero *Hypericum* L. en las Islas Canarias. Botanica Macaronesica, 21: 43-49.

Grieve C.M., Poss J.A., Shouse P.J. (2008) Modeling growth of *Matthiola incana* in response to saline wastewaters differing in nitrogen level. Hort. Science, 43 (6): 1787-1793.

Guedes A.P. (2009) Essential oils from plants and in vitro shoot cultures of *Hypericum androsaemum* L., *H. perforatum* L. and *H. undulatum* Schousboe ex. Wild. PhD Thesis. University of Minho. Campus Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

Guedes A.P., Gregory F., Fernandes-Ferreira M. (2012) *Hypericum* sp.: Essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 11: 127–152.

Guedes A.P., Luques R., Ferreira P., Almeida M.T., Fernandes-Ferreira M. (2009) Essential oil components of *Hypericum androsaemum* infusions and their nematotoxic effects against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chittwood. 8th Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting on Biopesticides, La Palma, Canary Islands, Spain, 21-25.

Gügi B., Orange N., Hellio F., Burini J.F., Guillou C., Leriche F., Guespin-Michel J.F. (1991) Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Bacteriology* 173 (12): 3814.

Gupta M.L., Prasad A., Ram M., Kumar S. (2002) Effect of the vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource technology*, 81: 77–79.

Halušková J., Cellárová E. (1997) RFLP analysis of *Hypericum perforatum* L. somaclones and their progenies, *Euphytica* 95: 229–235, 1997.

Hammer E.E.C, Pallon J., Wallander H., Olsson P.A. (2011) Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *Fems Microbiology Ecology*, 76: 236–244.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270: 313-321.

Hypericum online. hypericum.myspecies.info [ultimo accesso: 13/01/2015]

Hofland-Zijlstra J.D., Berendse F. (2009). The effect of nutrient supply and light intensity on tannins and mycorrhizal colonisation in Deutch heathland ecosystems. *Plant Ecology*, 201: 661–675.

Hollingsworth P.M., Graham S.W., Little D.P. (2011) Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 6 (5): e19254.

HOMOLAICUS.com. www.homolaicus.com, Storia delle piante Medicinali [ultimo accesso: 13/01/2015].

Hoyle G.L., Steadman K.J., Daws M.I., Adkins S.W., (2008) Pre- and post-harvest influences on seed dormancy status of an australian *Goodeniaceae* species, *Goodenia fascicularis*. *Annals of Botany*, 102: 93-101.

Jaleel C.A., Sankar B., Sridharan R., Panneerselvam R. (2008) effect of soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*, *Turk. Journal Biology*, 32: 79-83

Javidnia K., Miri R., Soltani M., Gholami M., Khosravi A.R., (2008). Essential oil composition of four *Hypericum* species from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (3): 374-377.

Jeuffroy M.H., Sebillotte M. (1997) The end of flowering in pea: influence of plant nitrogen nutrition. *European Journal of Agronomy*, 6: 15–24.

Kapoor R, Giri B, Mukerji KG. (2004) Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource*

technology, 93: 307–11.

Karioti A., Bilia A.R. (2010) Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 562-594.

Kasper S., Caraci F., Forti B., Drago F., Aguglia E. (2010) Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. *European Neuropsychopharmacology*, 20 (11): 747–765.

Karppinen K. (2010) Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *H. perforatum* L. (St. John's wort) Precursors and genes involved, *Acta Univ. Oul. A* 564.

Kilian B., Graner A. (2012) NGS technologies for analyzing Germplasm diversity in genebanks, *Briefings in functional genomics*: 1 – 13.

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111- 120.

Kirakosyan A., Hayashi H., Inoue K., Charchoglyan A., Vardapetyan H. (2000) Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53: 345-348.

Kitanov G.M. (2001) Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 171-178.

Kizil S., Inan M., Kirici S. (2013) Determination of the best herbage yield and hypericin content of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L) under semi-arid climatic conditions. *Turkish Journal of Field Crops*, 18 (1): 95-100.

Kusari S., Zühlke S., Borsch T., Spiteller M. (2009) Positive correlations between hypericin and putative precursors detected in the quantitative secondary metabolite spectrum of *Hypericum*. *Phytochemistry*, 70 (10): 1222–1232.

Linde K., Mulrow, C.D., Berner, M., Egger, M. (2008) St. John's wort for depression, <http://www.thecochranelibrary.com> [ultimo accesso: 13/01/2015]

Lingua G., Bona E., Manassero P., Marsano F., Todeschini V., Cantamessa S., Copetta A., D'Agostino G., Gamalero E., Berta G. (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization. *International journal of molecular sciences* 14: 16207–25.

Lotocka B., Osińska E. (2010) Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae) *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163: 70–86.

Maggi F., Cecchini C., Cresci A., Coman M.M., Tirillini B., Sagratini G., Papa F., Vittori S. (2010) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chemistry and biodiversity*, 7: 447-466.

Mandrone M., Lorenzi B., Scognamiglio M., Fiorentino A., Cornioli L., Sanna C., Antognoni F., Poli F. (2014) Phytochemical profile and biological activities evaluation of three species of *Hypericum*, *Book of abstracts*, 109° Congresso S.B.I., 2-5 september: XXIX.

Martonfi P., Repčák M., Ciccarelli D., Garbari F. (2001) *Hypericum perforatum* L. chemotype

without rutin from Italy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 659–661.

Martonfi P., Repčák M., Zanvit P. (2006) Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34: 56-59.

Matzk F., Meister A., Brutovska R., Schubert I. (2001) Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixes, *The Plant Journal*, 26 (3): 275-282

Mazandarani M., Yassaghi S., Rezaei M.B., Mansourian A.R., Ghaemi E.O. (2003) Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6: 354-358.

Micali G., Cappellano G., Lo Coco F., Mondello F., Lanuzza F. (2004) Nuova tecnologia di estrazione di principi attivi da piante medicinali, XXI Congresso Nazionale di Merceologia, Foggia 9: 22-24.

Mohammad A., Mitra B., Khan A.G. (2004) Effects of sheared-root inoculum of *Glomus intraradices* on wheat grown at different phosphorus levels in the field. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 103: 245–249.

Moose S.P., Mumm R.H. (2008) Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*, 147: 969–977.

Morone Fortunato I., Avato P. (2008) Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 93: 139–149.

Nacif de Abreu I., Porto A.L.M., Marsaioli A.J., Mazzafera P. (2004) Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, 167: 949–954.

Nogueira T., Marcelo-Curto M.J., Figueredo C., Barroso J.G., Pedro L.G., Rubiolo P., Bicchi C. (2008) Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: Geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 36:40-50.

Nahrstedt A., Butterweck V.(1997) Biologically Active and Other Chemical Constituents of the Herb of *Hypericum perforatum* L.. *Pharmacopsychiat.* 30: 129 – 134.

Nürk N.M. (2011) Phylogenetic analyses in St. John's wort (*Hypericum*) Inferring character evolution and historical biogeography, Tesi Dottorato di ricerca ,Università di Berlino.

Nürk N.M., Crockett S.L. (2011) Morphological and phytochemical diversity among *Hypericum* species of the Mediterranean basin, *Med Aromat Plant Sci Biotechnol.*; 5 (1): 14–28.

Odabas M.S., Radugiene J., Camas N., Janulis V., Ivanauskas L., Cırak C. (2009) The quantitative effects of temperature and light intensity on hyperforin and hypericins accumulation in *Hypericum perforatum* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (7): 519-525.

Oluk E.A., Orhan S. (2009) Thidiazuron induced micropropagation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *African Journal of Biotechnology*, 8 (15): 3506-3510.

Parvaiz A., Satyawati S. (2008) Salt stress and phytobiochemical responses – a review of plants, *Plant soil Environ.*, 54 (3): 89–99.

- Patočka J. (2003) The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Applied Biomedicine*, 1: 61–70.
- Perez-Garcia F., Huertas M., Mora E., Pena B., Varela F., Gonzalez-Benito M.E. (2006) *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1187–1198.
- Perner H., Schwarz D., Bruns C., Mäder P., George E. (2007) Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. *Mycorrhiza*, 17: 469–74.
- Perrone R., De Rosa P., De Castro O., Colombo P. (2013 a) A further analysis of secretory structures of some taxa belonging to the genus *Hypericum* (Clusiaceae) in relation to the leaf vascular pattern. *Turkish Journal of Botany*, 37: 847–858.
- Perrone R., De Rosa P., De Castro O., Colombo P. (2013 b) Leaf and stem anatomy in eight *Hypericum* species. *Acta Bot. Croat.*, 72 (2): 269–286.
- Pessarakly M. (1994) *Handbook of Plant and Crop Physiology*. 2nd. Edition Marcel Dekker, Inc. New York: 385–406.
- Pieroni A., Quave C. L., Santoro R.F. (2004) Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 373–384.
- Pistelli L., Bertoli A., Zucconelli S., Morelli I., Panizzi L., Menichini L. (2000) Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia*, 71 (1): 138–40.
- PFAF-Plants For A Future (PFAF) database, 7000 Edible, Medicinal & Useful Plants. Available at <http://www.pfaf.org> [ultimo accesso: 13/01/2015]
- Pharmacopoeia Europaea (2010), settima edizione.
- Pignatti S. (1982) *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna, vol. 3: 343–351.
- Poutaraud A., Girardin P. (2004) Agronomic and chemical characterization of 39 *Hypericum perforatum* accessions between 1998 and 2000. *Plant Breeding*, 123: 480–484
- Poutaraud A., Girardin P. (2005) Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example. *Plant Genetic Resources*, 3 (2): 178–189.
- Quintana-Ascencio P.F., Dolan R.W., Menges E.S. (1998) *Hypericum cumulicola* demography in unoccupied and occupied Florida scrub patches with different time-since-fire. *Journal of Ecology*, 86 (4): 640–651.
- Radun M. (2007) Conservation and utilisation of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) in Herzegovina. International Master Programme at the Swedish Biodiversity Centre, Master thesis N. 47, Uppsala Universitet, Sweden: 37 pp.
- Radušienė J., Kazlauskas S., Bagdonaitė E. (2004) Morphological and Chemical Evaluation on *H. perforatum* and *H. maculatum* in Lithuania. *Acta Hort.*, 629: 55–62.
- Raimondo F.M. (2004) Report on Iter Mediterraneum III. Boccone, 17.
- Rammal H., Bouayed J., Desor F., Younos C., Soulimani R. (2009) Notes ethnobotanique et phytopharmacologique de *Hypericum perforatum* L.. *Phytothérapie*, 7: 161–164

Rhoades J.D., Loveday J. (1990) Salinity in irrigated agriculture. Irrigation of Agricultural Crops. B.A. Stewart e D.R. Nielsen (Eds.), ASA Monograph: 1089-1142.

Ribeiro de Moraes (2009) Reproductive biology and cytology of *Hypericum brasiliense* Choisy (Hypericaceae) Rev. bras. Bot., 32 (3).

Rodríguez I., González C. H., De León A. M., Ramos T. (2007) Efecto de la aplicación de luz sobre la calidad floral del *Hypericum androsaemum* L. 'Excellent flair', Actas de Horticultura 48: 506-509.

Röder C, Schaefer M, Leucht S (2004) Meta-analysis of effectiveness and tolerability of treatment of mild to moderate depression with St. John's Wort, Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie 72 (6): 330-343.

Ruhfel B.R, Stevens P.F, Davis C.C. (2013) Combined morphological and molecular phylogeny of the clusioid clade (*Malpighiales*) and the placement of the ancient rosoid macrofossil *Paleoclusia*, Int. J. Plant Sci., 174 (6): 910–936.

Russo E., Scicchitano F., Whalley B.J., Mazzitello C., Ciriaco M., Esposito S., Patanè M., Upton R., Pugliese M., Chimirri S., Mammì M., Palleria C., De Sarro G. (2013) *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability and Clinical Drug–Drug Interactions. Phytotherapy Research, 28 (5): 643–655.

Saeb K., Kiaee A.A., Asadi M., Khalil P., Razieh J.H., Alireza E. (2011) Investigation of the effect of light intensity on five essential oils of *Hypericum perforatum* L. A case study of Ramsar, Mazandaran, Iran. Journal of Medicinal Plants Research, 5 (17): 4157-4161.

Saia S., Ruisi P., Amato G., Di Miceli G., Frenda A.S., Giambalvo D. (2012) Effects of soil inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and nutrient uptake of some Mediterranean species grown under rainfed conditions. 17th International Nitrogen Workshop 90-91.

Saia S., Amato G., Frenda A.S., Giambalvo D., Ruisi P. (2014) Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production and nitrogen fixation of berseem clover plants subjected to water stress (L-SP Tran, Ed.). PLoS ONE, 9: e90738.

Said-Al Ahl H.A.H., Omer E.A. (2011) Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. Herba polonica, 57, 1.

Santoro R.F. (2004) Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. Journal of Ethnopharmacology, 95: 373–384.

Savikin K., Dobrić S., Tadić V., Zdunić G. (2007) Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in rats. Phytotherapy Research 21: 176–180.

Saxena P.K., Cole I.B., Murch S.J. (2007) Approaches to quality plant based medicin: significance of chemical profiling. In: Applications of Plant Metabolic Engineering. R. Verpoorte, A.W. Alfermann and T.S. Johnson (Eds.), Springer, The Netherlands: 311–330

Schippmann U., Leaman D.J., Cunningham A.B. (2002) Impact of cultivation and gathering of Medicinal Plants on biodiversity: global trends and issues. In: FAO, 2002. "Biodiversity and the ecosystem approach in Agriculture, Forestry and Fisheries". Ninth Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Oct. 12–13, 2002. Inter-Departmental

Working Group on Biological Diversity for Food and Agriculture, Rome, 21 pp.

Scholten M., Donahue J., Shaw N.L., Serpe M.D. (2009) Environmental regulation of dormancy loss in seeds of *Lomatium dissectum* (Apiaceae). *Annals of Botany*.

Schwob I., Bessi re J.M., Viano J. (2002) Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France, *C.R. Biologies* 325: 781–785.

Selmar D. (2008) Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 1/2 (58): 139-144.

Sirvent T.M., Walker L., Vance N., Gibson D.M. (2002) Variation in hypericins from wild populations of *Hypericum perforatum* L. in the Pacific Northwest of the U.S.A. *Economic Botany*, 56 (1): 41–48.

Smelcerovic A., Verma V., Spiteller M., Ahmad S.M., Satish C.P., Ghulam N. (2006) Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. *Phytochemistry*, 67 (2): 171–177.

Smith S.E., Read D.J. (2008) Mycorrhizal symbiosis (S.E. Smith e D.J. Read, Eds.). Academic Press.

Soelberg J., J rgensen L.B., J ger A.K. (2007) Hyperforin Accumulates in the Translucent Glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany*, 99 (6): 1097-1100.

Spitali G. (1999) Plinio e i rimedi terapeutici dalle piante. www.medicinealtre.it/rivista-scientifica/1999/1_99_spitali_plinio.pdf [ultimo accesso: 13/01/2015]

Statti G.A., Conforti F., Menichini F., Marrelli M., Carmen G., Tundis R., Loizzo M.R., Bonesi M., Menichini F. (2011) Protective effect of *Hypericum calabricum* Sprengel on oxidative damage and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biol Res*, 44: 213-218.

Stojanovi  G., Dordevic A., Smelcerovic A. (2013) Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)? *Current Medicinal Chemistry*, 20: 2273-2295.

Suleyman K., Memet I., Saliha K. (2013) Determination of the best herbage yield and hypericin content of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under semi arid climatic conditions. *Turkish Journal of Field Crops*, 18 (1): 95-100.

Suntar I.P., Akkol E.K., Yilmazer D., Baykal T., Kirmizibekmez H., Alper M., Yesilada E. (2010) Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (2): 468–477.

Suozz R.M. (1998) *Il grande libro delle erbe medicinali*, Newton & Compton editori, Roma: 12-13.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Tanji K.K. (1990) *Agricultural salinity assessment and management*, American Society of Civil Engineers (New York), 71: 619 pp.

Taylorov  B. (2012) The potential of natural resources of *Hypericum maculatum* CRANTZ growing wild in Levo ske' Vrchy (Slovakia). *Journal of Scientific Agricultural Research*: 192-196

- Teng W., Deng Y., Chen X-P, Xu X-F, Chen R-Y, Lv Y., Zhao Y-Y., Zhao X-Q., He X., Li B. (2013) Characterization of root response to phosphorus supply from morphology to gene analysis in field-grown wheat. *Journal of experimental botany*, 64: 1403–11.
- Tocci N., Simonetti G., Diodata D'Auria F., Panella S., Palamara A. T., Valletta A., Pasqua G. (2011) Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthonerich extracts with antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91: 977–987.
- Tonk F.A., Giachino R.R.A, Sönmez Ç., Yüce S., Bayram E., Telci İ., Furan M.A. (2011) Characterization of Various *Hypericum perforatum* Clones by Hypericin and RAPD Analyses. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13: 31-37.
- Touafek O., Nacer A., Kabouche A., Kabouche Z. (2005) Analysis of the essential oil of algerian *Hypericum perforatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 20 (6): 669 - 670.
- Vila M., Maron J.L., Marco L. (2005) Evidence for the enemy release hypothesis in *Hypericum perforatum*. *Oecologia*, 142: 474–479.
- Vinocur B., Altman A. (2005) Recents advices engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, *Biotechnology*, 16:123–132.
- Wagner H., Blatt S. (1994) *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, Springer, vol.unico: 368 pp
- Wang D., Bai J., Sun F., Yang D. (2010) Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum ensiense* occurring in China, *Phytomedicine*, 17: 410–413.
- Wright D.P., Read D.J., Scholes J.D. (1998a) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L Plant, *Cell and Environment* 21: 881-891
- Wright D.P., Scholes J.D., Read D.J. (1998b) Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 21: 209–216.
- WHO - World Health Organization (2002) *The World health report: 2002: Reducing the risks, promoting healthy life*, Geneva, Switzerland: 248 pp.
- Zangheri P. (1976) *Flora italica I-II*, CEDAM, Padova
- Zanoli P. (2004) Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Reviews*, 10 (3): 203-218.
- Zare A.R., Solouki M., Omid M., Irvani N., Oladzad Abasabadi A., Mahdi Neza N. (2011) Effect of various treatments on seed germination and dormancy breaking in *Ferula assa foetida* L.(Asafetida), a threatened medicinal herb. *Trakia Journal of Sciences*, 9 (2): 57-61.
- Zdunic G.M., Godjevac D.M., Milenkovic M., Savikin K.P., Menkovic N.R., Petrovic S.D. (2014) Antiinflammatory and gastroprotective properties of *Hypericum richeri* oil extracts. *Journal of natural products, Natural Product Communications*, 5 (8): 1215-1218.
- Zeng Y., Guo L-P., Chen B.-D., Hao Z.-P., Wang J.-Y., Huang L.-Q., Yang G., Cui X.-M., Yang L., Wu Z.-X. (2013) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives. *Mycorrhiza*, 23: 253–65.

Zinati G.M., Bryan H.H., Li Y. (2000) Stratification enhances germination of purple coneflower (*Echinacea angustifolia*) and St. John's wort (*Hypericum perforatum*) seeds. Proc.Fla. State Hort. Soc. 113:172-174.

Zobayed S., Afreen F., Goto E., Kozai T. (2006) Plant–Environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. Annals of Botany, 98: 793–804.

Zobayed S., Afreen F., Kozai T. (2007) Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. Environmental and Experimental Botany, 59: 109–116.

Zubek S, Mielcarek S, Turnau K. (2012) Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 22: 149–156.

ALLEGATI

Lavori pubblicati nel corso del triennio di dottorato

Silvia Lazzara, Edoardo Napoli, Alessandra Carrubba

**Hypericum spp.: A Resource from Wild Mediterranean Flora
for the Treatment of Mild Depression**

In corso di stampa su: *Bioactive Phytochemicals: Perspectives
for Modern Medicine* Vol. 3: 337-352. M/S Daya Publishing
House, New Delhi.

***Hypericum* spp.: a resource from wild Mediterranean flora for the treatment of mild depression.**Silvia Lazzara¹, Edoardo Napoli, Alessandra Carrubba² *¹C.R.A. – S.F.M. (Agricultural Research Council - Research Unit for the recovery and the exploitation of Mediterranean Flower Species), S.S. 113 km 245,500, 90011 Bagheria, Palermo, Italy. E-mail silvia.lazzara@entecra.it² D/SAF (Department of Agricultural and Forestry Sciences, Università degli Studi di Palermo), viale delle Scienze ed. 4 ingr. L, 90128 Palermo, Italy. E-mail alessandra.carrubba@unipa.it* corresponding author**Abstract**

The genus *Hypericum* holds about 480 species (Crockett and Robson, 2011), widely spread throughout the world. A large part of them grows wild in the Mediterranean areas: 30 *Hypericum* taxa (26 species and 4 sub-species) have been detected in Italy, and about one third of them (11 taxa) are native to Sicily (Castellano and Spadaro, 2010). Actually, traditional and folk medicines in many parts of the world use *Hypericum* species for a plenty of different purposes. The most important are certainly two: the treatment of wounds and burns (because of the strong effects stimulating the formation of new tissue and lenitive of pain), and the therapy of moderate to mild depression (due to its remarkable hypnotic and tranquilizer effect, with specific antidepressant and anxiolytic effects). Besides these well-known actions, other biological effects of *Hypericum* extracts have been recognized in time, including antimicrobial, antioxidant, antiproliferative activities. Although many compounds have been identified in *Hypericum* extracts, however, which compound, or mixture of compounds, is exactly responsible for every specific pharmacological action it is not perfectly clear as far. The available literature agrees in ascribing a great importance to three active compounds, namely hypericin and pseudohypericin (two naphthodianthrone), and hyperforin (a phloroglucinol derivative). The occurrence of these substances in *Hypericum* extracts is highly variable, as an effect of both genetic factors (species and/or subspecies) and environmental conditions (growing site or cropping techniques). This paper makes a review of the information available in the newest literature about botanical and agronomical concerns, chemical composition and biological activity of *Hypericum* species, with a special emphasis to the treatment of depressive states. Original data about the content of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in several *Hypericum* species and populations coming from different Italian sites are also exposed and discussed.

***Hypericum* spp.: taxonomical and botanical aspects**

Hypericum is one out of the nine genera which form the botanical family *Hypericaceae* (APG III, 2009). According to Crockett and Robson (2011) the genus contains 484 species, spread worldwide throughout many highly diversified habitats, insomuch as in many areas it is claimed to be an invasive weed (Buckley et al., 2003).

Its major diversification center, as arguable by the high number of detected species, may be located in the temperate regions of Northern hemisphere (Crockett and Robson, 2011). Detailed information about the distribution of *Hypericum* taxa is available in Ciccarelli and Garbari (2004). A large part of them grows wild in the Mediterranean areas: 30 *Hypericum* taxa (26 species and 4 subspecies) have been detected in the peninsular part of Italy and in Italian islands (Conti et al., 2005), spanning from coastal areas and low plains to high mountain areas (about 1600 m a.s.l.).

Inside Sicilian flora, the genus *Hypericum* is formed by 11 native taxa (Giardina et al., 2007), homogeneously distributed in the inner part of the isle, from the dry and sunny coastal areas, to the riparian wetlands, to the woody and mountain areas.

Two species (*H. perforatum* and *H. perforatum*) are ubiquitous; they may be found in almost every environment, spanning from few to 800 - 1000 meters a.s.l., in arid meadows, grazing lands, wood borders, grasslands and roadsides. *H. calycinum* grows in sunny areas and fits to almost every soil type; it is cultivated rather everywhere as an ornamental plant in gardens and parks, but is considered spontaneous in Sicily as well (from 0 to 1000 m a.s.l.) (Castellano and Spadaro, 2010). *H. triquetrifolium* is typical of arid wildlands, where it may be found from the sea level to 800 m a.s.l.. It may be easily encountered in the Eastern part of Sicily. In smaller areas of Sicily other two species are present: *H. pubescens*, typical of humid (sometimes salty) environments, from 0 to 500 m a.s.l., detected in Western Sicily, and *H. tetrapterum*, from 0 to 800 m, typical of humid prairies, marshes, riversides and reeds. *H. androsaemum* may be found sparsely in Sicily from 0 to 1400 m a.s.l., inside woods or in shadowy and fresh slopes, both inside the Madonie and the Nebrodi parks, and *H. hircinum* as well, limited to wet and shadowy areas, from the coast level to 1200 m, in the areas of Messina and Palermo (Pignatti, 1982). *H. aegypticum* is an endemism, retrieved only inside the isle of Lampedusa on cliffs close the sea and in arid garrigue 0 to 200 m a.s.l., although its presence must be confirmed by further investigations. *H. australe* as well, was reported in wet meadows or in wood clearings, but its presence has not been confirmed recently (Giardina et al., 2007). *H. hirsutum* may be found on rather the whole Italian territory, exception made for Val d'Aosta, Sicily and Sardinia; it grows up inside the vegetation with tall woody and herbaceous plants, in coastal areas and clearings, from 0 to 1600 m a.s.l. Similarly, *H. montanum* may be found throughout all Italian territory, although it is missing from the islands. It was retrieved in oaks and beech woods, above all when in degradation phase, 0 to 1800 m a.s.l.

H. perforatum (St. John's Wort) is probably the most studied about all *Hypericum* species. As a morphological typical trait, different types of internal secretory cavity were found in aerial parts of the plant: translucent glands and three different types of secretory canals with different shapes, ontogenesis and localization (Ciccarelli et al., 2001). The frequency and diversity of these secretory structures evidence the intense secretory activity of the species. In *H. perforatum*, the naphthodianthrone hypericin and pseudohypericin are characteristic of the black nodules and they are not present in either glands or canals (Ciccarelli et al., 2001), whereas phloroglucinols, such as hyperforin, seem to be located in translucent glands in leaves, carpellar leaves and sepals (Bruni and Sacchetti, 2009).

Chemical composition of extracts

Phytochemical surveys on several *Hypericum* species demonstrated that they contain essential oils, flavonols (catechins), xanthones, coumarins, glycosides, anthraquinones, flavoglucynols, flavonoids, flavonolglycosides, lactones, pyrones, lipids, triterpenes, tannins, polyphenolics and phenylpropanes (caffeic, chlorogenic and neochlorogenic acids)

(Erken et al., 2001; Poutaraud and Girardin, 2004; Javidnia et al., 2008; Camas et al., 2012; Maltas et al., 2013).

Inside all of these compounds, two groups are identifiable, the first characterized by a fair hydrophily (proanthocyanins, flavonoids, biflavonoids, xantones, fenilpropanes and naphthodiantrones) and the second group with a more hydrophobic nature (essential oils and acylfloroglucinols) (Crockett, 2010). From the petroleum ether extract of the aerial parts of *H. calycinum*, a new floroglucynol derivative and five derivatives of cicloesadienone were isolated, only one of which (formerly isolated from *Hypericum chinense* L. and termed chinesin II) was already known in literature (Castellano and Spadaro, 2010).

Some of the identified compounds are responsible for several biological activities, spanning from antioxidant, antibacterial (Maltas et al., 2013), antifungal (Cakir et al., 2004), antiviral (Schmitt et al., 2001), antiproliferative (Donà et al., 2004), and even nematocidal (Guedes et al., 2009). However, plant metabolites that have been subjected to the attention of medicine and phytochemistry are above all naphthodiantrones, such as hypericin and pseudohypericin, many flavonoids, such as hyperoside, quercetin, rutin and quercitrin, xantones, but above all floroglucynols, such as hyperforin and adhyperforin (Castellano and Spadaro, 2010).

Hypericin and pseudohypericin, despite their different chemical structure, often are collectively termed as “hypericins” (fig. 1). Their presence in *Hypericum* plants has an important taxonomic value, since they are specific only for the more phylogenetically advanced taxa, and are completely absent in the primitive sections (Kitanov, 2001). Both of them are contained in aerial flowering parts of plants, in increasing amounts from the bottom to the upper part (Kizil et al., 2013), and tend to decrease as the plant ripening

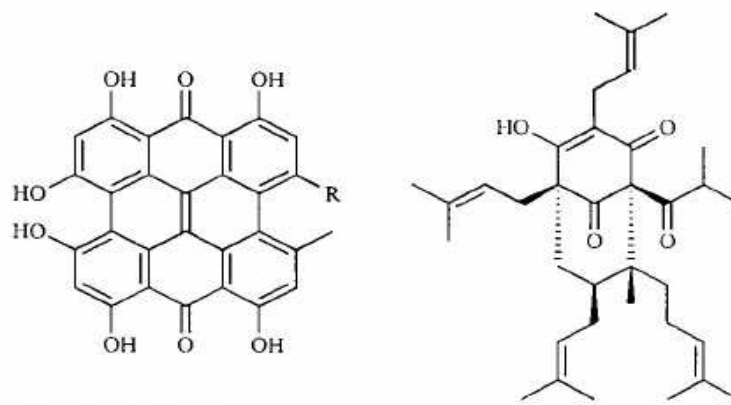


Figure 1 – Chemical structures of Hypericin (R = CH₃) and Pseudohypericin (R = CH₂OH) (on the left) and Hyperforin (on the right) (Stojanović et al., 2013, modif.)

process goes on, being about 10 folds higher in closed buds than in brown capsules (Berger-Büter and Büter, 2002). In *H. perforatum*, pseudohypericin is generally (but not always) detected in higher amounts than hypericin, with a ratio between them that seems mostly depending on the genotype (Poutaraud and Girardin, 2004; Karioti and Bilia, 2010). In *Hypericum* extracts such compounds are the best known and studied, above all because of their activity on the central nervous system. Their occurrence in plant extracts is highly variable, as an effect of both genetic factors (species and/or subspecies) and environmental conditions, such as growing site or cropping techniques (Kizil et al., 2013), harvest and post-harvest management, and extraction techniques (Poutaraud and Girardin, 2005).

In 2012 and 2013 (unpublished data) a survey activity was performed, collecting plant samples (picked up between the stages of full and end of flowering) of various species of *Hypericum* from several Mediterranean environments and at different altitudes. For the measurement of hypericin, pseudohypericin and hyperforin content, about 5 g of air-dried inflorescences were ground and put in ethanol (50 ml) at room temperature for 72 hours, in the dark and under continuous shakering. Each extract was filtered and the filter was washed thrice with 10 ml ethanol, thereafter it was dried with a rotavapor, and extract yield was measured (as percent of d.m.).

The chemical determinations were carried on by means of HPLC diode array analysis, in triplicate, by injecting 20 µL of a 10 mg/mL solution in methanol for each extract. The identification of compounds was performed by comparison of the chromatographic behavior of the samples with that of standards solutions with a known concentration.

Table 1: Extract yield (per cent) and average content in active metabolites (mg kg⁻¹ d.m.) in the flowering tops of several *Hypericum* species from various provenances.

Species	Provenance	Extract Yield (% d.m.)	Hypericin (mg kg ⁻¹ d.m.)	Pseudohypericin (mg kg ⁻¹ d.m.)	Hyperforin (mg kg ⁻¹ d.m.)
<i>H. aviculariifolium</i>	Turkey (Gümüş) ¹	-	2140	590	-
<i>H. barbatum</i>	Serbia (Suva Planina) ²	-	300	430	70
<i>H. calabricum</i>	Italy (Calabria) ³	-	30	-	3450
<i>H. calycinum</i>	Italy (Messina, Sicily)	33,8	-	-	429,5
<i>H. ensiense</i>	China (Badong) ⁴	-	3000	4700	-
<i>H. hircinum</i>	Italy (Messina, Sicily)	18,5	-	-	602,2
<i>H. hirsutum</i>	Italy (Siena, Tuscany) ⁵	21,4 ± 9,8	38,5 ± 14,5	15,8 ⁶	103,0 ± 82,6
	Serbia (Suva Planina) ⁷	-	40	-	60
<i>H. linarioides</i>	Serbia (Suva Planina) ⁸	-	20	-	20
<i>H. lyidium</i>	Turkey (Havza) ⁹	-	180	340	-
<i>H. maculatum</i>	Serbia (Suva Planina) ¹⁰	-	30	40	50
<i>H. monbretii</i>	Turkey (Çakalli) ¹¹	-	1390	1170	
<i>H. montanum</i>	Italy (Ancona, Marche)	25,5	417,2	447,8	309,9
	Italy (Arezzo, Tuscany)	23,1	410,3	381,8	135,5
<i>H. orientale</i>	Turkey (Merzifon) ¹²	-	-	90	-

¹ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

² Smelcerovic *et al.*, 2006; data previously expressed in mg g⁻¹

³ Statti *et al.*, 2011; data previously expressed in mg g⁻¹

⁴ Wang *et al.*, 2010; data previously expressed in mg g⁻¹

⁵ mean value of 2 accessions ± standard deviation

⁶ value obtained in only one accession over two

⁷ Smelcerovic *et al.*, 2006; data previously expressed in mg g⁻¹

⁸ Smelcerovic *et al.*, 2006; data previously expressed in mg g⁻¹

⁹ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

¹⁰ Smelcerovic *et al.*, 2006; data previously expressed in mg g⁻¹

¹¹ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

<i>H. origanifolium</i>	Turkey (Çakalli) ¹³	-	1430	1111	-
<i>H. perfoliatum</i>	Italy (Palermo, Sicily) ¹⁴	23,8 ± 6,2	304,0 ± 149,2	878,7 ± 466,3	6740,7 ± 5708,9
	Italy (Messina, Sicily)	22,5	252,1	1052,8	12999,5
	Italy (Agrigento, Sicily) ¹⁵	15,3 ± 3,9	322,4 ± 74,8	756,7 ± 164,0	1970,0 ± 1335,1
	Turkey (Çakalli) ¹⁶	-	1060	2110	-
<i>H. perforatum</i>	Italy (Agrigento, Sicily) ¹⁷	20,0 ± 6,0	357,0 ± 189,2	358,6 ± 274,2	8626,5 ± 5214,8
	Italy (Ancona, Marche)	27,6	291,6	311,3	4855,8
	Italy (Arezzo, Tuscany) ¹⁸	24,0 ± 6,0	445,6 ± 206,3	511,3 ± 302,5	5035,6 ± 2821,8
	Italy (Firenze, Tuscany) ¹⁹	23,5 ± 0,1	635,5 ± 65,6	816,7 ± 181,2	3412,4 ± 180,4
	Italy (Isernia, Molise) ²⁰	22,6 ± 4,0	238,5 ± 108,5	481,9 ± 332,9	6483,7 ± 853,1
	Italy (Messina, Sicily)	34,5	786,1	1357,2	8906,0
	Italy (Naples, Campania)	25,3	954,2	840,9	3953,3
	Italy (Palermo, Sicily) ²¹	25,1 ± 7,3	515,1 ± 337,3	555,9 ± 340,8	8397,7 ± 7521,2
	Italy (Roma, Latium) ²²	19,5 ± 10,3	351,7 ± 79,7	505,3 ± 288,3	3990,8 ± 371,7
	Italy (Siena, Tuscany) ²³	20,4 ± 4,6	261,2 ± 40,3	542,6 ± 249,3	6596,3 ± 1477,3

¹² Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

¹³ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

¹⁴ mean value of 10 accessions ± standard deviation

¹⁵ mean value of 3 accessions ± standard deviation

¹⁶ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

¹⁷ mean value of 11 accessions ± standard deviation

¹⁸ mean value of 10 accessions ± standard deviation

¹⁹ mean value of 2 accessions ± standard deviation

²⁰ mean value of 2 accessions ± standard deviation

²¹ mean value of 15 accessions ± standard deviation

²² mean value of 2 accessions ± standard deviation

²³ mean value of 4 accessions ± standard deviation

	Italy (Trento, Trentino) ²⁴	24,7 ± 5,0	176,7 ± 90,5	485,5 ± 311,1	4060,5 ± 2521,3
	Italy (various sites, Tuscany) ²⁵	-	112 ± 38	189 ± 37	4822 ± 1019
	Italy (various sites, Tuscany) ²⁶	-	115 ± 49	329 ± 151	2764 ± 845
	USA (Montana) ²⁷	-	97,5 ± 39,6	555,0 ± 125,8	-
	USA (California) ²⁸	-	230,0 ± 111,7	2105,0 ± 556,9	-
	Turkey (Samsun) ²⁹	-	2820	1860	-
	Unknown ³⁰	-	1500	4000	32200
<i>H. pruinatum</i>	Turkey (Gümüş) ³¹	-	790	520	-
<i>H. pubescens</i>	Italy (Palermo, Sicily)	29,6 ± 5,4	228,3 ± 178,7	799,1 ± 248,2	1517,7 ± 1249,7
<i>H. rumeliacum</i>	Serbia (Rudina Planina) ³²	-	180	180	70
<i>H. tetrapterum</i>	Italy (Arezzo, Tuscany)	20,7	844,0	583,0	9384,3
	Italy (Messina, Sicily)	18,5	540,0	431,0	3989,3
	Italy (Roma, Latium)	29,1	252,6	837,4	3298,6
	Serbia (Rudina Planina) ³³	-	90	100	110

Although it is not easy to ascertain how much of this variability is due to real differences among genotypes and how much is due to differences in analytical methods, experimental management or conditions of the plant material in use, the amounts in hypericin,

²⁴ mean value of 3 accessions ± standard deviation

²⁵ average ± standard deviation of 14 values from a chemotype without rutin (Mártonfi *et al.*, 2001); data probably expressed in mg g⁻¹

²⁶ average ± standard deviation of 12 values from a chemotype without rutin (Mártonfi *et al.*, 2001); data probably expressed in mg g⁻¹

²⁷ mean value of 4 accessions from Montana (Sirvent *et al.*, 2002); data previously expressed in %

²⁸ mean value of 4 accessions from California (Sirvent *et al.*, 2002); data previously expressed in %

²⁹ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

³⁰ Wang *et al.*, 2010; data previously expressed in mg g⁻¹

³¹ Çirak *et al.*, 2007; data previously expressed in mg g⁻¹

³² Smelcerovic *et al.*, 2006; data previously expressed in mg g⁻¹

³³ Smelcerovic *et al.*, 2006; data previously expressed in mg g⁻¹

pseudohypericin and hyperforin show a wide range of variation according to the species and, inside species, according to the genotype. A better understanding of the causes of such variability, however, should imply the elucidation of the reasons why *Hypericum* plants produce such metabolites. One interesting theory, surely deserving of further in-depth examination, suggests that plants synthesize such compounds in response to several stress agents, such as salt and drought (Selmar, 2008) or herbivore attacks (Sirvent et al., 2002).

Hypericum as a pharmaceutical item

Traditional and folk medicines in many parts of the world use *Hypericum* species for a plenty of different purposes. They are considered as possessing a range of properties, including antimicrobial, antiviral, antioxidant, antiproliferative, antidepressant, antiepatotoxic, stimulating for blood circulation, beneficial for gastric and duodenal ulcer, intestinal catarrh, cold affections, and visual disturbances (Bruni, 1999; Pistelli et al., 2000; Schmitt et al., 2001; Donà et al., 2004; Sánchez-Mateo et al., 2005; Almeida et al., 2009; Franchi et al., 2011; Guedes et al., 2012; Stojanović et al., 2013). In Herzegovina, *Hypericum perforatum* is reported to be collected from the wild in large quantities, ranking among the top 5 medicinal plants in the preference of collectors (Radun, 2007). In Portugal, many *Hypericum* species (*H. androsaemum*, *H. perforatum*, *H. undulatum*) are used in traditional medicine to treat liver and kidney problems or migraine (Guedes et al., 2012). In Italy, extracts from *H. hircinum* are widely used against cough (Pieroni et al., 2004). In Russia, *Hypericum* is used for wound healing and skin care formulations, but also added in the traditional Russian beverage ("Baikal") to treat winter depression (Kireeva et al., 1999). In Iran, two endemic *Hypericum* species (*H. perforatum* and *H. androsaemum*) are traditionally used as diuretic, wound healing, sedative and antibacterial agents (Mazandarani et al., 2003). Native Americans used the root of several wild *Hypericum* species for internal use in the treatment of severe body impairment and fever, and for external use against the snakebites (Frichsen Brown, 1989). In the Canary Islands, where about 10 *Hypericum* species may be found, some of them are used in folk medicine for the treatment of wounds and also as sedative, diuretic, vermifuge, antihysterical and antidepressant (Rabanal et al., 2005; Sánchez-Mateo et al., 2005). Aerial parts of *Hypericum* plants (mainly *H. perforatum*) are largely used to treat contusions, wounds, burns and ulcerations, since they offer a strong lenitive effect of pain and stimulate the formation of new tissue (Frichsen Brown, 1989; Bombardelli and Morazzoni, 1995; Castellano and Spadaro, 2010). In Southern Italy and Sicily, the *Hypericum* extract form that is most used for this purpose is the oil, traditionally obtained by means of a 40-days maceration of the fresh flowers in vegetable oil (olive and sunflower), until the liquid becomes red (Lentini, 2000).

Despite all this variety of traditional uses all over the world, the most important and well-known activities of *Hypericum* extracts are certainly the anti-inflammatory, healing and antidepressant ones. Actually, although many compounds have been identified in *Hypericum* extracts, which active substance, or mixture of substances, is exactly responsible for each specific pharmacological action, it is not perfectly clear as far. For evaluating the quality of the drugs, the *Hypericum* formulations in use for therapy are standardized according to the total content of some selected specific compound; the European Pharmacopoeia, e.g., takes as a reference index the total content in naphthodianthrone, i.e., hypericins (hypericin and pseudohypericin) on total dry extract. The concentration of total hypericins in *Hypericum* sprout and flowers may range among

very different values, but for market quality a minimum hypericin amount of 0,04% (400 mg kg⁻¹) is required (Wagner and Bladt, 1994). Hypericin has called the attention of research due to its antiviral and antitumor action associated with a significant photosensitizing activity, that could suggest its utility in some specific antitumor treatments with photodynamic therapy (De Witte, 1998; Miskovsky, 2002; Karioti and Bilia, 2010). As concerns the antidepressant *Hypericum* activity, anyway, several studies seem to conclude that the major responsible for this effect is hyperforin (Chatterjee et al., 1998; Stevinson and Ernst, 1999; Müller et al., 2001; Caccia and Gobbi, 2011). This finding should suggest the opportunity to determine quality standard for hyperforin content, and not only for hypericins, when plant has to be addressed to this kind of therapy. A major problem in such sense is due to the instability of hyperforin in light and air, which requires a special care in handling and storage of extracts (Mennini and Gobbi, 2004).

Antidepressive and sedative effects

One of the most concerning aspects of the industrialized western countries lifestyle is the widespread arising of pathologic expressions linked to the emotional and psychological contest, variously expressed as more or less severe anxious-depressive states, sleep disorders and expressions of social maladjustment generically but effectively defined as “stress” (Gabel, 1998). In listing depression among the numerous stress-related problems, WHO claims it as one of the most worrying mental diseases (WHO, 2012 and 2013).

The therapeutic approach toward this pathology takes into consideration the use of a great deal of pharmaceutical items, mostly obtained by chemical synthesis. Following a larger market and production trend, however, this sector of pharmaceutical industry as well is gradually oriented towards the utilization of active compounds of plant origin, in the belief (although under continuous verification) that, besides of causing fewer toxicity phenomena, they do not generate dependence.

Indeed, the utilization of plant extracts in order to cure several widespread pathologic manifestations is rather an ancient practice (Chia, 2005). In several countries, some *Hypericum* species, the most famous being St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), are considered as phytoterapeutic agents and used in many pharmaceutical items of free trading (Larkin, 2000). In the treatment of moderate depression *Hypericum* extracts have been demonstrated more effective than placebo, although less effective than conventional antidepressant (Mennini and Gobbi, 2004; Stevinson and Ernst, 1999). The plant is effectively used against menopause stress syndrome and excitability, above all when they generate depression. It normalizes the sleep both in case of insomnia and hypersomnia. It is effective in the treatment of pain and neuralgic affections. It possesses a sedative effect with specific antidepressant activity, acting in relieving the anxious condition, and is used as a part of therapy for the psychological instability, due to its healthy and regenerating effect on nervous system and on all emotional manifestations.

Hypericum works by means of biochemical mechanisms of action that are similar, although not identical, to those of the elective medicines against mild to moderate depression, i.e. the Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors (SSRIs), such as fluoxetine (Prozac), paroxetine (Paxil) and sertraline (Zoloft) (Mennini and Gobbi, 2004). The available studies suggest, in particular, that the extract of *H. perforatum* and *H. perforatum* act by means of slowing the re-uptake of neuro transmittants (serotonine, dopamine, noradrenaline) at central nervous system level (Do Rego, 2007). This action, however, seems to exhibit at rather high concentrations. These extracts, moreover, do not show negative effects on the

wakefulness state, attention and memory, do not alter the sleep phases and do not generate dependence.

Further experiments allowed to attribute similar effects also to other *Hypericum* species, such as *H. canariense*, *H. glandulosum* and *H. calycinum*. Researches about the effects on the central nervous system of these extracts have shown an effectiveness similar to that of the Tricyclic Antidepressant (TCAs), such as desipramine (Norpramin), trimipramine (Surmontil) and imipramine (Tofranil), that have been compared to these plant extracts in animal models (Sánchez-Mateo et al., 2005; Castellano and Spadaro, 2010).

Although in many controlled trials, no clinically relevant side effects have been reported (Stevinson and Ernst, 1999), some caution is suggested during pregnancy and breastfeeding (Russo et al., 2013). Furthermore, interactions between St John's wort and several drugs have been documented. Among the most relevant interactions, a reduced blood concentration of ciclosporin, indinavir, warfarin, and anticancer drugs has been claimed (Breidenbach et al., 2000; WHO, 2006; Borrelli and Izzo, 2009), as well as serotonin syndrome or lethargy when *Hypericum* is used with SSRIs (Russo et al., 2013), and interferences with hormonal metabolism that could reduce the efficacy of oral contraceptives (Hall et al., 2003).

Wild or cultivated?

A rich literature takes into consideration many aspects of the researches about *Hypericum*, both agronomical (adaptability, cropping techniques, yields) and chemical-pharmacological (yield in active compounds and their effectiveness, doses and administering ways, clinical effects (Giachetti et al., 1998; Zanolini et al., 1998 a and b; Larkin, 2000; Bruni and Sacchetti, 2009). Unfortunately, most papers referring to the activity of herbal extracts seem to pay little importance to the provenience of the plant material. A deep debate is starting about the opportunity to use only wild plant material, which is sometimes considered more effective than the cultivated one. Actually, many considerations discourage the massive use of plant material taken from the wild (Crockett and Robson, 2011). First, the amounts of active principles in wild plants are subjected to high variations, due to the occurrence of many uncontrollable and unforeseeable environmental factors. Second, picking up from the wild of plant material may be considered an acceptable practice only when the required amounts are low, but becomes unsustainable as the requirements begin to get higher. Many examples all around the world may be done, of plants that after an uncontrolled collection from the natural stations are now at risk of extinction. Hence, the opportunity to achieve sustainable plant collection practices is advocated (Radun, 2007), and cultivation is increasingly recognised as the only real opportunity to obtain high quantities of plant biomass with a known quantity of active principles.

As it is well known, a good management of cropping techniques may put plants in conditions to express their potentialities at maximum level. Of course, much work must still be done, and some crucial aspects of cropping technique, such a fertilization or irrigation, besides post-harvest technology, must be refined.

Some preliminary trials about the suitability of *Hypericum* to the field cultivation have been performed, and the plant has shown a good productivity even under low input conditions (Carrubba et al., 2010). Undoubtedly, as for all other plant secondary metabolites, a proper cropping technique may affect the hypericins content. Experimental activity about this topic is however sparse. A trial performed with different N rates and ways of application allowed to obtain hypericin contents ranging from 0,08 and 0,13 %,

achieving the maximum values after application of 150 kg N ha⁻¹ in two solutions (Berti et al., 2000). Otherwise, Briskin et al. (2000) found that N supply in *Hypericum* caused a decrease in hypericin content in leaves, whereas a moderate N stress (although producing a general depression in all growth plant parameters) enhanced the hypericin content. Inoculation of *H. perforatum* with AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) significantly enhanced the content in hypericin and pseudohypericin, probably as a consequence of the improved plant nutrient adsorption, whereas no effect on hyperforin concentration was found (Zubek et al., 2012). Other environmental factors, furthermore, are claimed to exert an effect on the content in *Hypericum* active molecules: pseudohypericin content decreased from 2.3 to 1.4 mg/g in *Hypericum perforatum* plants experiencing a phytoplasma infection, whereas the content in hypericin did not show any significant variation (Bruni et al., 2005).

The amounts of hypericin and hyperforin in plants are not inter-correlated, hence the possibility exists to address plant breeding towards the enhancement of one compound, or both (Poutaraud and Girardin, 2004). Genetic engineering may be therefore a useful tool to obtain highly-yielding genotypes, more suitable to the needs of industry. This goal can be achieved by means of the classical breeding and selection methods: a seven-times increase of the mean content of hypericins was e.g. obtained in the fourth generation of fieldgrown *Hypericum perforatum* plants (Koperdáková et al., 2007).

Finally, a strong relevance has to be attributed also to the newest biotechnology techniques, e.g. including *in vitro* cell and tissue cultures (Brutovská et al., 1998). Relevant amounts of hypericin, pseudohypericin and other metabolites (such as flavonoids, procyanidins, and others) have been obtained from cell cultures of *H. perforatum*, *H. maculatum*, and other *Hypericum* species (Kartnig et al., 1996), also with the help of elicitors such as mannan (Kirakosyan et al., 2000).

References

- Almeida I.F., Fernandes E., Lima J.L.F.C., Cardoso Costa P., Bahia M.F., (2009). In vitro protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105: 222–227.
- APG III, (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105–121.
- Berger-Büter K., Büter B., (2002). Ontogenic variation regarding hypericin and hyperforin levels in four accessions of *Hypericum perforatum* L. *J. Herbs, spices and Medicinal Plants*, 9: 95-100.
- Berti M., Hevia F., Wilckens R., Joublan J.P., Serri H., Allende J. (2000). Fertilización nitrogenada del cultivo de Hierba de san Juan (*Hypericum perforatum* L.) en Chillan, provincia de Ñuble, Chile. *Cien. Investig. Agr.*, 27 (2): 107-116. (In Spanish, with English abstract).
- Bombardelli E., Morazzoni P., (1995). *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 66: 43-68.

Borrelli F., Izzo A.A., (2009). Herb–Drug interactions with St John’s Wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. The AAPS Journal, 11 (4) : 710-727.

Breidenbach Th., Hoffmann M.W., Becker Th., Schlitt H., Klempnauer J., (2000). Drug interaction of St John’s wort with ciclosporin. The Lancet, 355: 1912.

Briskin D.P., Leroy A., Gawienowski M., (2000). Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John’s wort. Plant Physiol. Biochem., 38 (5): 413–420.

Bruni A., (1999). Farmacognosia generale e applicata. I farmaci naturali. Piccin, Padova: 338 (In Italian).

Bruni R., Pellati F., Bellardi M.G., Benvenuti S., Paltrinieri S., Bertaccini A., Bianchi A., (2005). Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. Affected by Ash Yellows Phytoplasma Infection. J Agric Food Chem, 53 (4): 964-968.

Bruni R., Sacchetti G., (2009). Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). Molecules, 14: 682-725.

Brutovská R., Čellárová E., Doležel J., (1998). Cytogenetic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. Plant Science, 133: 221–229.

Buckley Y.M., Briese D.T., Rees M., (2003). Demography and management of the invasive plant species *Hypericum perforatum*. II. Construction and use of an individual-based model to predict population dynamics and the effects of management strategies. Journal of Applied Ecology, 40: 494–507.

Caccia S., Gobbi M., (2011). Hyperforin in St. John’s Wort’s central effects: what is the mechanism of action? Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 5 (1): 78-85.

Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S., Hirata T., (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour and Fragrance Journal, 19: 62–68.

Camas N., Radusiene J., Stanius Z., Caliskan O., Cirak C., 2012. Secondary metabolites of *Hypericum leptophyllum* Hochst., an endemic Turkish species. The Scientific World Journal, Article ID 501027: 4 pp.

Carrubba A., Catalano C., Militello M., 2010. Prove di coltivazione di iperico (*Hypericum perforatum* L.) in ambiente semi-arido. Raccolta degli atti - 4° Convegno Nazionale Piante Mediterranee - Le potenzialità del territorio e dell’ambiente: 209-213 (In Italian).

Castellano G., Spadaro V., 2010. *Hypericum calycinum* (Clusiaceae) in Sicilia: aspetti farmacognostici e corologici, Quaderni di Botanica ambientale e applicata, 21: 29-32. (In Italian, with English abstract)

Chatterjee S.S., Bhattacharya S.K., Wonnemann M., Singer A., Müller W.E., (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sciences*, 63 (6): 499-510.

Chia G., 2005. L'iperico: l'antidepressivo naturale – Macroedizioni- Librisalus (In Italian)

Ciccarelli D., Andreucci A.C., Pagni A.M., (2001). Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany*, 88: 637-644

Ciccarelli D., Garbari F., (2004). Le unità italiane di *Hypericum* (Clusiaceae), serie *Hypericum*. *Informatore Botanico Italiano*, 36 (2): 413-424. (In Italian)

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C., 2005. An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Roma, Palombi Editore, 32: 3-97.

Crockett S.L., (2010). Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). *Nat. Prod. Commun.*, 5 (9): 1493–1506.

Crockett S.L., Robson N.K.B., 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5 (1): 1-13.

Çirak C., Radušienė J., Janulis V., Ivanauskas L. Arslan B., (2007). Chemical constituents of some *Hypericum* species growing in Turkey. *Journal of Plant Biology*, 50 (6): 632-635.

De Witte P., (1998). Hypericin as photosensitizer. *Fitoterapia*, 69 (suppl. 5): 26-28.

Donà M., Dell'Aica I., Pezzato E., Sartor L., Calabrese F., Della Barbera M., Donella-Deana A., Appendino G., Borsarini A., Caniato R., Garbisa S., (2004). Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, 64 (17): 6225-6232.

Do Rego J.C., (2007). Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *European Journal of Pharmacology*, 569 (3): 197–203.

Erken S., Malyer H., Demirci F., Demirci B., Başer K.H.C., (2002). Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey - I. Chemistry of Natural Compounds, 37: 434–438.

Franchi G.G., Nencini C., Collavoli E., Massarelli P., (2011). Composition and antioxidant activity *in vitro* of different St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (17): 4349-4353.

Frichsen Brown C., (1989). Medicinal and Other Uses of North America Plants: A Historical Survey with Reference to the Eastern Indian Tribes. – Dover Publications, New York: 382 pp.

Gabel T.L., (1998). Herbal medications, nutraceuticals, and anxiety and depression. Chapt. 11 in: "Herbal Medicinals. A clinician's guide", Miller L.G. and Murray W.J. (Eds.), Haworth Press Inc., New York – London: 205-226.

Giachetti D., Ghiglieri O., Tolu P., Scheggi S., Gambarana C., (1998). Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* total extracts on two animal models of depression. *Fitoterapia*, 64 (suppl. 5): 29.

Giardina G., Raimondo F.M., Spadaro V., (2007). A catalogue of plants growing in Sicily. *Boccone*, 20: 5-582.

Guedes A.P., Gregory F., Fernandes-Ferreira M., (2012). *Hypericum* sp.: Essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 11: 127–152.

Guedes A., Luques R., Ferreira P., Almeida M.T., Fernandes-Ferreira M., (2009). Essential oil components of *Hypericum androsaemum* infusions and their nematotoxic effects against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chittwood. 8th Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting on Biopesticides, La Palma, Canary Islands, Spain, 21-25 September 2009. Available at: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/18481> (last accessed July 23rd 2014).

Hall S.D., Wang Z., Huang S.-M., Hamman M.A., Vasavada N., Adigun A.Q., Hilligoss J.K., Miller M., Gorski J. C., (2003). The interaction between St John's wort and an oral contraceptive. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 74 (6): 525-535.

Javidnia K., Miri R., Soltani M., Gholami M., Khosravi A.R., (2008). Essential oil composition of four *Hypericum* species from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (3): 374-377.

Karioti A., Bilia A.R., (2010). Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 562-594.

Kartnig T., Göbel I., Heydel B., (1996). Production of Hypericin, Pseudohypericin and Flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. *Planta Medica*, 62: 51-53.

Kirakosyan A., Hayashi H., Inoue K., Charchoglyan A., Vardapetyan H., (2000). Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53: 345-348.

Kireeva T.B., Sharanov U.L., Letchamo W., (1999). Biochemical and eco-physiological studies on *Hypericum* spp. In: *Perspectives on new crops and new uses*, Janick J. (Ed.), ASHS Press, Alexandria, VA: 467–468.

Kitanov G.M., (2001). Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 171 – 178.

- Kizil S., Inan M., Kirici S., (2013). Determination of the best herbage yield and hypericin content of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under semi-arid climatic conditions. Turkish Journal of Field Crops, 18 (1): 95-100.
- Koperdánková J., Košuth J., Čellárová E., (2007). Variation in the content of hypericins in four generations of seed progeny of *Hypericum perforatum* somaclones. J Plant Res, 120: 123–128.
- Larkin M., (2000). St John's Wort included in US depression guidelines. The Lancet, 355: 1619.
- Lentini F., (2000). The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. Fitoterapia, 71: 583 - 588.
- Maltas E., Uysal A., Yildiztugay E., Aladag M.O., Yildiz S., Kucukoduk M., (2013). Investigation of antioxidant and antibacterial activities of some *Hypericum* species. Fresenius Environmental Bulletin, 22(3a): 862 – 869.
- Mártonfi P., Repčák M., Ciccarelli D., Garbari F., (2001). *Hypericum perforatum* L. - chemotype without rutin from Italy. Biochemical Systematics and Ecology, 29: 659–661.
- Mazandarani M., Yassaghi S., Rezaei M.B., Mansourian A.R., Ghaemi E.O., (2003). Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. Asian Journal of Plant Sciences, 6: 354-358.
- Mennini T., Gobbi M., (2004). The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. Life Sciences, 75: 1021–1027.
- Miskovsky P., (2002). Hypericin - A New Antiviral and Antitumor Photosensitizer. Current Drug Targets, 1 (3): 55-84.
- Müller W.E., Singer A., Wonnemann M., (2001). Hyperforin - Antidepressant Activity by a Novel Mechanism of Action. Pharmacopsychiatry, 34 (1): 98-102.
- Pieroni A., Quavec C.L., Santoro R.F., (2004). Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. Journal of Ethnopharmacology, 95: 373–384.
- Pignatti S., (1982). Flora d'Italia, 1. Edagricole, Bologna: 343-351.
- Pistelli L., Bertoli A., Zucconelli S., Panizzi L., Menichini F., (2000). Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. Fitoterapia, 71 (1): 138–140.
- Poutaraud A., Girardin P., (2004). Agronomic and chemical characterization of 39 *Hypericum perforatum* accessions between 1998 and 2000. Plant Breeding, 123: 480-484.

Poutaraud A., Girardin P., (2005). Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example. *Plant Genetic Resources* 3 (2): 178–189.

Rabanal R.M., Bonkanka C.X., Hernández-Pérez M., Sánchez-Mateo C.C., (2005). Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 591–596.

Radun M., (2007). Conservation and utilisation of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) in Herzegovina. International Master Programme at the Swedish Biodiversity Centre, Master thesis N. 47, Uppsala Universitet, Sweden: 37 pp.

Russo E., Scicchitano F., Whalley B.J., Mazzitello C., Ciriaco M., Esposito S., Patanè M., Upton R., Pugliese M., Chimirri S., Mammì M., Palleria C., De Sarro G., (2013). *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug–Drug Interactions. *Phytotherapy Research*, 28 (5): 643–655.

Sánchez-Mateo C.C., Bonkanka C.X., Prado B., Rabanal R.M., (2005). Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. extracts in the forced swimming test in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 541–547.

Schmitt A.C., Ravazzolo A.P., von Poser G.L., (2001). Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 239–245.

Selmar D., (2008). Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 1/2 (58): 139-144.

Sirvent T.M., Walker L., Vance N., Gibson D.M., (2002). Variation in hypericins from wild populations of *Hypericum perforatum* L. in the Pacific Northwest of the U.S.A. *Economic Botany*, 56 (1): 41–48.

Smelcerovic A., Verma V., Spiteller M., Mudasir A.S., Puri S.C., Qazi G.N., (2006). Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. *Phytochemistry*, 67: 171–177.

Statti G.A., Conforti F., Menichini F., Marrelli M., Gangale C., Tundis R., Loizzo M.R., Bonesi M., Menichini F., (2011). Protective effect of *Hypericum calabricum* Sprengel on oxidative damage and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biol Res*, 44: 213-218.

Stevinson C., Ernst E., (1999). *Hypericum* for depression. An update of the clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology* 9: 501–505.

Stojanović G., Đorđević A., Šmelcerović A., (2013). Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)? *Current Medicinal Chemistry*, 20 (18): 2273-2295.

Wagner H., Bladt S., (1994). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas, Springer, Jena: 368 pp.

Wang D., Bai J., Sun F., Yang D., (2010). Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum ensiense* occurring in China. *Phytomedicine*, 17: 410–413.

WHO, (2006). The safety of medicines in public health programmes: Pharmacovigilance an essential tool. World Health Organization, Geneva, Switzerland: 60 pp.

WHO, (2012). Depression. Fact sheet N° 369, October 2012. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/> (last accessed: July 1st, 2014)

WHO, (2013). Guidelines for the Management of Conditions Specifically Related to Stress. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85119/1/9789241505406_eng.pdf?ua=1 (last accessed: July 1st, 2014).

Zanoli P., Avallone R., Truzzi C., Vezzadini F., Baraldi M. (1998a). Pharmacological profile of flavonoids present in medicinal plants with sedative and anxiolytic properties. *Fitoterapia*, 64 (5): 17.

Zanoli P., Truzzi C., Cannazza G., Vandenberghe A., Kamuhabwa A., de Witte P., Merlevede W., Baraldi M., (1998b). Evidence that *Hypericum perforatum* extracts exert anxiolytic effect in rats. *Fitoterapia*, 64 (5): 30.

Zubek S., Mielcarek S., Turnau K., (2012). Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 22: 149-156.

Silvia Lazzara, Alessandra Carrubba, Edoardo Napoli

Valorizzazione produttiva della biodiversità in ambiente mediterraneo: il genere *Hypericum*

Atti X Convegno Nazionale sulla Biodiversità – Roma, 3-5 settembre 2014: 46.

X CONVEGNO NAZIONALE SULLA BIODIVERSITÀ

Roma, CNR Sede Centrale, 3-5 Settembre 2014

<http://www.sisef.it/xbio/>



ID Contributo: #xbio-111

Lazzara S*, Carrubba A, Napoli E

VALORIZZAZIONE PRODUTTIVA DELLA BIODIVERSITÀ IN AMBIENTE MEDITERRANEO: IL GENERE HYPERICUM

Riassunto:

Il genere *Hypericum*, diffuso in tutto il mondo con circa 500 specie, in Italia è rappresentato da 30 taxa, distribuiti dalle zone costiere fino ad habitat montani (0-1600 m slm), comprendenti 26 specie e 4 sottospecie. Nella flora siciliana è presente con 9 specie: *H. aegypticum*, *H. androsaemum*, *H. australe*, *H. hircinum* subsp. *majus*, *H. perforatum*, *H. perforatum* (subsp. *perforatum*, *veronense* e *angustifolium*), *H. pubescens*, *H. tetrapterum*, *H. triquetrifolium*, a cui recentemente si è aggiunto *H. calycinum* localizzato e definito come spontaneizzato in Sicilia. Una conoscenza più approfondita di tali specie, finalizzata alla loro introduzione negli ordinamenti colturali come specie di interesse industriale e/o ornamentale, comporta un perfezionamento nella descrizione dei parametri morfologici e ambientali delle piante nei loro siti di vegetazione spontanea, ed uno specifico accertamento delle loro caratteristiche fitochimiche. Un'attività di ricognizione a tale scopo è stata svolta negli anni 2012-2013, nei periodi corrispondenti alle fasi di fioritura e di maturazione dei semi. In Sicilia le aree perlustrate da giugno-luglio (momento della fioritura) a settembre-ottobre (momento della raccolta dei semi), hanno interessato 4 province: Trapani, Palermo, Messina e Agrigento ed hanno portato all'individuazione di 23 accessioni: 9 di *H. perforatum*, 8 di *H. perforatum* e le rimanenti di *H. pubescens*, *H. tetrapterum* e *H. calycinum*. Altre escursioni sono state effettuate in Italia centrale, nell'appennino toscano-romagnolo, permettendo la localizzazione di ulteriori 7 popolazioni comprendenti *H. perforatum*, *H. androsaemum*, *H. montanum*, *H. tetrapterum* e *H. calycinum*. Altre accessioni di *H. perforatum*, *H. hirsutum*, *H. androsaemum* e *H. tetrapterum* si sono inoltre aggiunte, grazie all'invio di semi da parte di alcuni Orti Botanici nazionali. Tutti i semi acquisiti sono stati posti in coltura, mentre la raccolta dei fiori in situ ha consentito l'analisi chimica degli estratti etanolici delle accessioni nello stesso anno della raccolta, permettendone una prima valutazione qualitativa sulla base del contenuto in ipericina, iperforina e pseudoipericina. Ad oggi sono state esaminate 20 accessioni distribuite tra le diverse specie; il contenuto in principi attivi ha rivelato un notevole livello di variabilità tra le specie, mentre più circoscritto risulta il grado di variabilità tra le accessioni intraspecifiche. L'attività di valutazione è tuttora in corso; tra le piante originate da seme, particolarmente degne di interesse sembrano alcune provenienze di *H. perforatum* che hanno mostrato un habitus peculiare (piccola taglia e/o portamento ricadente) e per le quali sembra ipotizzabile una valorizzazione come specie ornamentali.

Parole Chiave: *Hypericum* spp., Popolazioni Siciliane, Parametri Qualitativi, Ornamentale

Tipologia: ORAL

Tematica Convegno: (4) BIODIVERSITÀ E SVILUPPO LOCALE

Inviato il: March 19, 2014 (15:33)

Inviato da: Silvia Lazzara (Università di Palermo, Palermo)

Silvia Lazzara, Eliana Landini, Sergio Saia, Giancarlo Fascella,
Alessandra Carrubba

**Studi preliminari sulla propagazione gamica e vegetativa di
Hypericum perforatum in ambiente mediterraneo**

Atti X *Convegno Nazionale sulla Biodiversità* – Roma, 3-5
settembre 2014: 116.

X CONVEGNO NAZIONALE SULLA BIODIVERSITÀ

Roma, CNR Sede Centrale, 3-5 Settembre 2014

<http://www.sisef.it/xbio/>



ID Contributo: #xbio-143

Lazzara S*, Landini E, Saia S, Fascella G, Carrubba A

STUDI PRELIMINARI SULLA PROPAGAZIONE GAMICA E VEGETATIVA DI *HYPERICUM PERFORATUM* IN AMBIENTE MEDITERRANEO

Riassunto:

La conoscenza dei fattori che influenzano la propagazione di una specie rappresenta un passo cruciale nella messa a punto di idonee strategie per la sua moltiplicazione di massa e introduzione in coltura, sia in campo che in ambiente controllato. Nel caso dell'iperico, di cui è nota la bassa percentuale di germinabilità del seme, sono stati approfonditi alcuni aspetti della propagazione gamica, verificando in particolare le migliori condizioni di germinazione attraverso specifiche prove in vitro. A tale scopo sono stati studiati gli effetti di variabili diverse (temperatura, substrato, soddisfacimento delle esigenze in freddo, carica batterica) sulla germinazione del seme di una accessione siciliana di *Hypericum perforatum*. Gli studi sono stati mirati a conoscere gli effetti sulla germinazione dei semi di tre variabili sperimentali: la vernalizzazione dei semi; l'andamento del regime termico; la presenza/assenza di batteri promotori della crescita (*Pseudomonas fluorescens*). Si è ritenuto opportuno, inoltre, approfondire gli studi anche sulle potenzialità di moltiplicazione vegetativa della specie, da proporre come possibile alternativa all'impiego del seme, sia per la coltivazione in pieno campo sia in tutti i casi in cui l'uso di piante di provenienza clonale è considerato preferibile. La prova di moltiplicazione agamica ha previsto il prelievo, in due epoche diverse (aprile e novembre), di talee semilegnose da piante di *H. perforatum* al secondo anno di vita. Le talee ricavate sono state poste a radicare su tre diversi substrati, con e senza l'impiego di un ormone radicante (acido naftalenacetico), e collocate in ambiente controllato. Al termine della prova è stata rilevata la percentuale di radicazione delle talee, e le radici prodotte da ogni talea sono state contate e sottoposte alla misurazione della lunghezza e del peso (fresco e secco). I risultati ottenuti dalle prove in vitro hanno mostrato il positivo effetto della vernalizzazione sulle percentuali di germinazione in tutte le condizioni sperimentali, mentre la prova di moltiplicazione agamica ha evidenziato un diverso comportamento rizogeno in funzione del substrato impiegato..

Parole Chiave: Germinazione, Radicazione, Substrati, Vernalizzazione, PGPR

Tipologia: POSTER

Tematica Convegno: (0)

Inviato il: April 05, 2014 (09:42)

Inviato da: Silvia Lazzara (Università di Palermo, Palermo)

Alessandra Carrubba, Silvia Lazzara, Edoardo Napoli

Prove di coltivazione di *Hypericum perforatum* L. in ambiente mediterraneo

Atti X Convegno Nazionale sulla Biodiversità – Roma, 3-5 settembre 2014: 174.

X CONVEGNO NAZIONALE SULLA BIODIVERSITÀ

Roma, CNR Sede Centrale, 3-5 Settembre 2014

<http://www.sisef.it/xbio/>



ID Contributo: #xbio-110

Carrubba A*, Lazzara S, Napoli E

PROVE DI COLTIVAZIONE DI *HYPERICUM PERFORATUM* IN AMBIENTE MEDITERRANEO

Riassunto:

La richiesta di *Hypericum perforatum* da parte dell'industria farmaceutica e cosmetica, sia come droga grezza che come derivati di prima trasformazione, in questi ultimi anni si sta incrementando mentre la sua disponibilità commerciale appare ancora piuttosto limitata. La possibilità di introduzione negli ordinamenti culturali mediterranei delle diverse specie di *Hypericum* è divenuta dunque potenzialmente assai interessante, ma richiede ancora la definizione di numerosi aspetti relativi alla risposta delle specie alla coltivazione, sia in pieno campo che in vaso, soprattutto quando questa viene condotta in ambienti diversi da quelli di vegetazione naturale. L'approfondimento di tali aspetti tecnici permetterebbe di ottimizzare le rese sia sul piano della quantità che della qualità, rispettando, al contempo, il criterio della massima efficienza nell'uso delle risorse produttive. A tale scopo, accessioni di *H. perforatum* ottenute da seme proveniente da tre diverse regioni italiane, rispettivamente del nord (Trento), centro (Siena) e sud (Agrigento), nell'autunno 2012 sono state poste sia in pieno campo che in vaso, allo scopo di confrontarne la risposta bio-agronomica e produttiva. Le piante sono state coltivate in due distinti ambienti: presso la sede aziendale del CRA-SFM, in comune di Bagheria (PA; circa 55 m slm), dove sono state svolte le prove in vaso, e presso l'azienda sperimentale "Sparacia" dell'Università degli Studi di Palermo, nel comune di Cammarata (AG; circa 450 m slm), dove le piante sono state poste in piena terra. Per tutta la durata della coltivazione, in ambedue gli ambienti, le piante sono state continuamente monitorate per valutarne l'accrescimento e le condizioni fitosanitarie. La raccolta delle sommità fiorite è stata effettuata nel momento di massima fioritura, avvenuta nel periodo tra giugno e luglio dell'anno successivo a quello della semina. Contemporaneamente, su un campione rappresentativo di 5 piante per ogni accessione ed ambiente, sono stati rilevati i seguenti parametri: altezza pianta, numero di fusti con e senza fiori, peso fresco della pianta intera, peso fresco delle sommità fiorite, peso erboristico (dopo essiccazione all'aria e all'ombra) e peso secco (previa essiccazione in stufa a 105 °C per 24 hh). Campioni rappresentativi di sommità fiorite essiccate per ogni trattamento sono stati sottoposti ad estrazione in etanolo, e sugli estratti ottenuti sono state determinate le rese in ipericina, iperforina e pseudoipericina. Tra le diverse provenienze sono state evidenziate interessanti differenze nei periodi di fioritura, nelle quantità di prodotto commerciale raccolto e nel contenuto in principi attivi, con una risposta produttiva particolarmente soddisfacente da parte dell'accessione siciliana. *H. perforatum* si conferma quindi come una specie potenzialmente assai interessante in vista della sua introduzione nei sistemi culturali mediterranei, dove potrebbe svolgere un ruolo significativo per l'incremento del livello di multifunzionalità aziendale.

Parole Chiave: Ambienti, *Hypericum* Spp, Coltivazione, Agrotecnica

Tipologia: POSTER

Tematica Convegno: (4) BIODIVERSITÀ E SVILUPPO LOCALE

Inviato il: March 18, 2014 (09:56)

Inviato da: Alessandra Carrubba (D/SAF - Università di Palermo, Palermo)

Silvia Lazzara, Alessandra Carrubba, Edoardo Napoli

Characterization and hypericins content in some *Hypericum* species from Sicily

Atti 23° Congresso SILAE– Marsala (TP), 7-12 settembre 2014:
PO106

Characterization and Hypericins content in some *Hypericum* species from Sicily

Lazzara, S.¹; Carrubba, A.^{2*}; Napoli, E.³

¹dr, CRA-SFM, Bagheria (PA), Italy

²Prof, D/SAF, Università di Palermo, Palermo, Italy

³dr, ICB-CNR, Catania, Italy

*alessandra.carrubba@unipa.it

Introduction

Different species belonging to the genus *Hypericum* are distributed into many environments of Sicily, where they represent an important component of wild Sicilian flora. Among these, *H. perforatum* (St John's Wort) is certainly the most common and famous; its floral parts are largely and traditionally used as a folk herbal remedy for treatment of wounds and burns, and considered an important raw matter for pharmaceutical industry due to their acknowledged antidepressant and sedative properties. Although it is not completely clear yet which compounds are responsible for the biological activity of *Hypericum*, the European Pharmacopoeia takes as a reference index for evaluating the quality of the drugs, the total content in naphthodianthrones, i.e., in hypericins (hypericin and pseudohypericin) on total dry extract. The concentration of hypericins in sprout and flowers may range from 0,06% and 0,75%, but for market quality a minimum hypericin amount of 0,04% is required (Wagner and Bladt, 1994). Other *Hypericum* species besides *H. perforatum* contain appreciable hypericins amounts, and therefore could represent alternative raw matter sources for industry.

Method

In 2012 and 2013 a survey activity was performed in Sicily, collecting samples of *Hypericum* spp. in various areas and at different altitudes. The inflorescences were air-dried, and 5 g approx of the material was ground and treated with ethanol (50 ml) for extraction, being continuously shakered for 72 hh in the dark. The extract was filtered and the filter was washed thrice with 10 ml ethanol each, thereafter it was dried with a rotavapor. In this way, the yield in percent of each sample was calculated. Later on, the HPLC analyses were carried on, in triplicate, by injecting 20 µL of a 10 mg/mL solution in methanole "HPLC grade" for each extract.

The determination of the content in active substances (hypericin, hyperforin and pseudohypericin) was carried on by means of gas-chromatographic analysis. The identification of hypericin was performed by comparison of the chromatographic behavior of the samples with that of solutions of standard hypericin with a known concentration.

Results / Discussion / Conclusion

Species	Provenance	EXTR (%)	HYPC (mg kg ⁻¹)	HYPF (mg kg ⁻¹)	PSPC (mg kg ⁻¹)
<i>H. hirsutum</i>	Sicily	11,7	23,7	0,1	15,8
<i>H. perforatum</i>	Sicily	13,8	198,2	0,2	564,2
<i>H. tetrapterum</i>	N-C Italy	20,7	844,6	1,9	583,9
	Sicily	18,5	540,5	1,0	431,9
	Mean	19,6	692,6	1,4	507,9
<i>H. perforatum</i>	N-C Italy	16,6	301,6	1,2	227,1
	Sicily	17,6	345,2	1,1	265,2
	Mean	17,3	330,7	1,1	252,5
EXTR: extract yield (%); HYPC: hypericin d.m. (mg kg ⁻¹); HYPF: hyperforin d.m. (mg kg ⁻¹); PSPC: pseudohypericin d.m. (mg kg ⁻¹)					

Exception made for *H. hirsutum*, that expressed very low values, all the other examined species have shown interesting hypericins contents. *H. perforatum* from Sicily exhibited higher values than the other provenances.

Bibliographic References

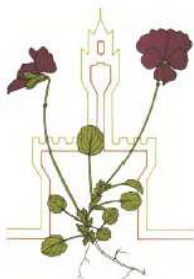
- Giardina et al., 2007. A catalogue of plants growing in Sicily. Bocconea, 20: 5-582.
- Wagner H., Bladt S. 1994. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas, Springer, Jena: 368 pp.

Giovino A., Lazzara S., Domina G., Diliberto G., Scibetta S.

**Evaluation of DNA barcoding approach in *Hypericum* spp.
discrimination**

Atti 109° Congresso SBI– Firenze, 2-5 settembre 2014:

4.5 Biotechnologies.PO163



International Plant Science Conference (IPSC) from Nature to Technological Exploitations

Florence, 2 – 5 September 2014

Poster 163

4.5 = EVALUATION OF THE DNA BARCODING APPROACH IN *HYPERICUM* SPP. DISCRIMINATION

ANTONIO GIOVINO^{1,*}, SILVIA LAZZARA¹, GIANNANTONIO DOMINA², GIUSEPPE DILIBERTO¹, SILVIA SCIBETTA¹

¹Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Unità di ricerca per il recupero e la valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee (CRA-SFM), Bagheria (PA); ²Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo. *e-mail: antonio.giovino@entecra.it

Hypericum genus, with more than 450 species, is widespread in temperate zones all over the world.

In Italy 30 taxa are known, 26 species and 4 subspecies; 10 of them are native of Sicily, in addition to *H. calycinum* which was found as naturalized.

Hypericum biochemical compounds (flavonoids, coumarins, glycosides, sesquiterpenes, tannins, volatile oils) are well recognized for many pharmacological activities: anti-inflammatory, improving blood flow, against traumas, in wounds and burns recovering. The most important activity is ascribed to the hypericin, a compound especially derived from *Hypericum perforatum* L., with successfully application in anti-depressive phytotherapy.

The medical field relevance and the related commercial interest led to the input for improving the taxonomic identification method to dispose of certain plant material. Methods for fast and accurate identification of the plant species are required to support morphological characterization.

In this study the potential of the “DNA Barcoding” molecular method was investigated in discriminating the Italian *Hypericum* taxa in order to develop an easy authentication assay helpful in solving taxonomic doubts or in commercial trade traceability of whole plants, portions or derived products.

The samples range was mainly recovered from native habitats in Italy, during the flowering period. Some samples were also sourced from certified herbarium collection.

The DNA extraction was carried in three biological replicates, according to CTAB protocol for plant material (1). The DNA bank and also the *ex-situ* collection are stored at CRA-SFM of Bagheria.

The three plastid regions, *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA*, were assessed, according to the CBOL Plant Working Group indications (2). Phylogenetic analysis of each molecular marker were conducted by comparing sequences including those available from international databases (BOLD/NCBI) based on Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). The preliminary results indicate the effectiveness of the method in discriminating the taxa of *Hypericum*, suggesting the possibility to build a fast and accurate molecular identification method by barcode.

1) Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15

2) CBOL Plant Working Group (2009). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 12 794–12 797

Giancarlo Fascella, Marcello Airò, Gaetano Giardina, Michele
Massimo Mammano, Alessandra Carruba, Silvia Lazzara

***IN VITRO* ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF
SICILIAN HYPERICUM PERFORATUM**

**6th International Symposium on production and
establishment of micropropagated plants**

19-24 Aprile 2015 San Remo Italy



6th International Symposium on production and establishment of micropropagated plants

19-24 Aprile 2015 San Remo Italy

IN VITRO ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF SICILIAN HYPERICUM PERFORATUM

Giancarlo Fascella, Marcello Airò, Gaetano Giardina, Michele Massimo Mammano, Alessandra Carruba, Silvia Lazzara

Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per il recupero e la valorizzazione delle Specie Floricole Mediterranee, Palermo, Italy.

Keywords: St. John's wort, micropropagation, plant growth regulators, root system, *ex-vitro* establishment

Hypericum perforatum L. (also known as St. John's wort) has been used for over 2000 years as a traditional medicinal plant because of different bioactive compounds (hyperforin, hypericin and pseudohypericin) with documented antidepressant activity. Plantlets mass production (rooted or unrooted) with high and uniform content of these secondary metabolites has been recently enhanced through *in vitro* culture but, in many cases, the process has been stopped at the multiplication phase with few available information on rooting and acclimatization. The definition of a complete micropropagation protocol would add knowledge on nursery activities aimed to the mass production of genotypes with peculiar characteristics (hardiness, low exigencies, rapid growth, etc.). Therefore, a study was conducted in order to set up an efficient *in vitro* rooting and acclimatization protocol of a *H. perforatum* Sicilian genotype well-adapted to south Mediterranean conditions (high radiation and temperatures).

Eight weeks old seedlings were used as explant sources (nodal segments) for *in vitro* initiation culture. Aseptic explants were transferred on to a Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 4.44 μM 6-benzyladenine (BA). Microshoots were then transferred on to specific culture media for *in vitro* rooting in order to evaluate the nutrients concentration and different auxins effect. Full and half-strength MS + 0, 5.71 μM indole-3-acetic acid (IAA) or 4.9 μM indole-3-butyric acid (IBA) were compared. Microshoots rooting rate, number of roots/shoot, root length and weight of rooted shoots were recorded after 40 days. Nutrients concentration of the media and the two different auxins significantly affected *in vitro* rooting of *H. perforatum*. The highest rooting rate was achieved on a half-strength hormone free MS, a higher number of roots on to half-strength MS supplemented with 4.9 μM IBA, whereas the longest roots were recorded on the half-strength MS enriched with 5.71 μM IAA. Rooted plantlets were *ex-vitro* acclimatized by transferring them into greenhouse in plastic pots filled with peat, perlite and their mixture (1:1, v/v) under mist (85% relative humidity). Acclimatization rate, after 40 days transplanting, was higher for plants grown in peat/perlite substrate.